

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA**



**Nuevas formulaciones orales, tópicas y parenterales de  
anfotericina B con acción antifúngica y antiparasitaria**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR:

**Dolores Remedios Serrano López**

Directores:

Dr. Juan José Torrado Durán

Dra. M<sup>a</sup> Paloma Ballesteros Papantonakis

**Madrid, 2013**



**Tesis Doctoral**

**NUEVAS FORMULACIONES ORALES, TÓPICAS Y  
PARENTERALES DE ANFOTERICINA B  
CON ACCIÓN ANTIFÚNGICA  
Y ANTIPARASITARIA**

**Dolores Remedios Serrano López**

*Directores:*

Dr. Juan José Torrado Durán

Dra. M<sup>a</sup> Paloma Ballesteros Papantonakis

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica**

**Madrid, 2013**





**Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a una Beca Predoctoral  
FPU concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte del  
Gobierno de España (Ref: AP2008-00235)**



## ***Agradecimientos***

*Quisiera dedicar la finalización de esta Tesis Doctoral a todas aquellas personas que de una manera o de otra se han ido cruzando en mi camino a lo largo de este proceso, sin los cuales no hubiera sido posible alcanzar esta meta.*

*Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, el Dr. Juan José Torrado Durán y la Dra. M<sup>a</sup> Paloma Ballesteros Papantonakis por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora. Les agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.*

*Hago extensivos estos agradecimientos a los profesores del Departamento de Tecnología Farmacéutica que me han acompañado durante todos estos años.*

*No puedo olvidarme de dar las gracias a la Dra. Gloria Molero, del Departamento de Microbiología, y en especial al Dr. Francisco Bolás, del Departamento de Parasitología y a la Dra. M<sup>a</sup> Auxiliadora Dea, de la Universidad CEU de Valencia no sólo por ofrecerme sus valiosos conocimientos y experiencia profesional, sino también por animarme y alentarme en cada una de las fases de la investigación, porque sin ellos no habría sido capaz de llegar hasta aquí.*

*Agradezco la inestimable ayuda de todos los veterinarios que han permitido que este trabajo pudiera ser llevado a cabo. Gracias a la Dra. Guadalupe Miró, a la Dra. Ana Montoya y a Leticia Hernández, del Departamento de Sanidad Animal y también a Ibán González de la Universidad CEU de Valencia.*

*Gracias a todos mis compañeros de Departamento con los que he compartido los buenos y los no tan buenos momentos a lo largo de estos años de tesis. Gracias por haberme ofrecido vuestra amistad y vuestro apoyo y sobre todo por haber disfrutado de infinitas experiencias juntos. Gracias a todas las personas que ya se fueron, pero que dejaron durante su paso por galénica un recuerdo muy especial como Helga, Gusiluz, M<sup>a</sup> Mar y Thuy. Gracias a todos los que aún siguen, sin los que hoy no puedo imaginar*

*mi estancia en el Departamento, en especial Claudia, Roberto, Lili, Esther, María, Ana y Carmen. Y también a todas las personas como Pablo, que me han hecho ver el vaso medio lleno y no medio vacío.*

*A mis amigos, en especial a Bombi por su inagotable paciencia y por siempre ser la primera en hacerme sonreír cuando lo necesito. También gracias a Maca, Celia, Jesús, Noe, Gema, María, Álvaro y Paco por sus consejos, por sus ánimos y por todos los momentos que hemos compartido juntos a lo largo de estos años.*

*Quiero además expresar mi agradecimiento a la Prof. Ijeoma Uchegbu por haberme acogido en numerosas ocasiones en su grupo de investigación durante estos años, en donde he podido compartir experiencias con personas increíbles de casi todos los lados del mundo. En especial gracias a Katerina por darme siempre su constante apoyo y enseñarme a ver las cosas desde una perspectiva diferente, pero también a Ramesh, Funmi, Gulnara, Manghook, Francesca, Preethi, Karwai, Natrah, Vicky, Qi y Tedus.*

*Y gracias siempre a mi familia, por estar a mi lado. Gracias a mi hermano, por su apoyo incondicional a lo largo de este camino; gracias a mi abuela, por creer en mí y por su cariño y a mis tíos por haberme motivado en todo momento. Gracias en especial a mis padres, a quienes jamás encontraré la forma de agradecer el cariño, comprensión y apoyo brindado en los momentos buenos y malos de mi vida, hago este triunfo compartido, sólo esperando que comprendan que mis ideales y esfuerzos son inspirados en cada uno de ellos.*

# Índice

Abreviaturas.....	1
RESUMEN .....	5
SUMMARY .....	7
1. INTRODUCCIÓN .....	11
1.1. Anfotericina B .....	11
1.1.1. Antecedentes históricos.....	11
1.1.2. Estructura y propiedades fisicoquímicas.....	13
1.1.2.1. Estructura .....	13
1.1.2.2. Solubilidad .....	14
1.1.2.3. Estado de agregación .....	15
1.1.2.4. Morfología y tamaño .....	21
1.1.2.5. Grado de cristalinidad.....	24
1.1.2.6. Estabilidad y conservación .....	26
1.1.3. Propiedades espectroscópicas .....	28
1.1.3.1. Espectroscopía Ultravioleta-Visible .....	28
1.1.3.2. Espectroscopía infrarroja .....	31
1.1.3.3. Espectroscopía de fluorescencia .....	33
1.1.4. Propiedades farmacológicas.....	35
1.1.4.1. Mecanismo de acción.....	35
1.1.4.2. Espectro de acción .....	41
1.1.4.3. Resistencias.....	42
1.1.5. Medicamentos comercializados y propiedades farmacocinéticas.....	43
1.1.6. Toxicidad y eficacia .....	48
1.1.6.1. Efectos adversos .....	48
1.1.6.2. Toxicidad, eficacia y coste.....	49
1.1.7. Indicaciones terapéuticas y posología.....	51
1.1.7.1. Indicaciones terapéuticas .....	51
1.1.7.2. Posología.....	52
1.1.8. Nuevas formulaciones de anfotericina B .....	53
1.1.8.1. Administración por vía IV .....	53
1.1.8.2. Administración por vía tópica.....	55

1.1.8.3.	Administración por VO .....	57
1.1.8.4.	Otras vías de administración.....	63
1.2.	Enfermedades tratadas con anfotericina B .....	64
1.2.1.	Leishmaniasis .....	64
1.2.1.1.	Epidemiología.....	64
1.2.1.2.	Ciclo biológico.....	66
1.2.1.3.	Respuesta inmunitaria.....	68
1.2.1.4.	Clínica.....	69
1.2.1.5.	Tratamiento frente a <i>Leishmania</i> .....	71
1.2.2.	Micosis .....	74
1.2.2.1.	Micosis invasivas.....	74
1.2.2.2.	Micosis cutáneas .....	75
1.2.2.3.	Tratamiento antifúngico.....	76
2.	JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO .....	81
2.1.	Justificación e hipótesis .....	81
2.2.	Objetivos y planteamiento .....	82
3.	PUBLICACIONES .....	87
3.1.	Primera publicación.....	87
	<i>Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations</i> .....	87
	Resumen de los objetivos y discusión de los resultados .....	103
3.2.	Segunda publicación.....	107
	<i>A novel formulation of solubilised amphotericin B designed for ophthalmic use</i> .....	107
	Resumen de los objetivos y discusión de los resultados .....	113
3.3.	Tercera publicación .....	115
	<i>Oral particle translocation to lung, liver and spleen confers oral amphotericin B activity in visceral leishmaniasis</i> .....	115
	Resumen de los objetivos y discusión de los resultados .....	147
4.	DISCUSIÓN FINAL.....	153
5.	CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS .....	167
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	173
9.	ANEXO I.....	195

## Abreviaturas

<b>AEMPS</b>	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
<b>AmA</b>	Anfotericina A
<b>AmB</b>	Anfotericina B
<b>AUC</b>	Área bajo la curva
<b>Bid</b>	Dos veces al día
<b>C</b>	Carbono
<b>CCA</b>	Concentración crítica de agregación
<b>CD</b>	Ciclodextrina
<b>Cl</b>	Aclaramiento
<b>CL</b>	Leishmaniasis cutánea
<b>CMC</b>	Concentración crítica micelar
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis individual de una sustancia que provoca la muerte del 50% de la población
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DSPE</b>	Distearoilfosfatidiletanolamina
<b>FTIR</b>	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier
<b>GCPQ</b>	Quaternary Ammonium Palmitoyl Glycol Chitosan
<b>GRAS</b>	Listado de excipientes cuyo uso se considera por lo general seguro (Generally Regarded As Safe)
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>IM</b>	Intramuscular
<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>IV</b>	Intravenoso
<b>MCL</b>	Leishmaniasis mucocutánea
<b>ND</b>	Dato no disponible
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno

<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>SLN</b>	Nanopartículas sólidas lipídicas
<b>SRE</b>	Sistema del retículo endotelial
<b>t<sub>1/2</sub></b>	Semivida de eliminación
<b>t<sub>max</sub></b>	Tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima
<b>TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>USP</b>	Farmacopea de los Estados Unidos
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V<sub>d</sub></b>	Volumen de distribución
<b>VL</b>	Leishmaniasis visceral
<b>VO</b>	Vía oral



# Anfotericina características físico químicas biodistribución prolongada circulación AmBisome Fungizona anfotericina tamaño

## Resumen/Summary

plasmática amplio volumen de distribución  
tamaño de partícula anfotericina B  
poliagregados sistema de retículo endotel  
toxicidad hemolítica macrófagos *Leishmania*  
AmB Beagle shipotensión ciclo dextrinas  
chitosán modificado anfotericina B  
poliagregado tamaño de partícula absorción  
oral toxicidad hemolítica biodistribución  
prolongada circulación plasmática amplio  
volumen de distribución tamaño de partícula  
anfotericina B poliagregados sistema de retículo  
endotel toxicidad hemolítica macrófagos *Leis*



## RESUMEN

La anfotericina B (AmB) es un fármaco caracterizado por presentar un amplio espectro antifúngico y antiparasitario. Se administra por vía parenteral debido a su mínima absorción oral. A pesar de su eficacia, su uso clínico se ve limitado por la aparición de efectos adversos, principalmente nefrotoxicidad y hemólisis. La Fungizona® primer medicamento comercializado, ha sido desplazada en muchos países por las nuevas formulaciones lipídicas de AmB que presentan un balance beneficio/riesgo más favorable, pero sin embargo, tienen un coste muy elevado. Por esta razón, existe una necesidad clínica de desarrollar formulaciones de AmB que presenten una buena relación coste-eficacia y que sean seguras para tratar infecciones fúngicas y parasitarias.

Con este objetivo se desarrollaron nuevas formulaciones parenterales de AmB combinando diferentes estrategias como encapsulación en microesferas de albúmina, diferentes estado de agregación (monómero, dímero y poliagregado) y modificación del tamaño de partícula de la formulación. La toxicidad hemolítica se reduce al incrementar el tamaño de partícula de los agregados y al encapsular el fármaco en microesferas de albúmina. La administración IV de la AmB poliagregada se caracteriza por una rápida desaparición de sangre seguida de la acumulación de AmB en tejidos del sistema retículo endotelial y una lenta eliminación del organismo con un tiempo medio de residencia de 65 h. Por consiguiente, la AmB poliagregada constituye una alternativa segura y coste-efectiva al AmBisome® para el tratamiento de enfermedades como la leishmaniasis, ya que el fármaco es vectorizado hacia los órganos donde los parásitos están acumulados en el organismo.

Aunque existen importantes avances en el desarrollo de formulaciones de AmB por vía parenteral, sin embargo, el progreso hacia otras vías de administración no invasivas es más limitado. Por el momento, las infecciones fúngicas oculares se suelen tratar con colirios preparados a partir de la Fungizona®, con el agravante de que es necesaria su preparación diaria y además causa irritación en el paciente. La formulación preparada a partir del complejo AmB-ciclodextrina (CD) tiene una actividad antifúngica un 30% superior a la Fungizona®, es fácil de preparar y mantiene su actividad antifúngica y características fisicoquímicas estables durante al menos un mes.

De manera similar, no se conoce ninguna formulación de AmB comercializada para el tratamiento de infecciones sistémicas que sea administrada por vía oral. Se ha conseguido aumentar la biodisponibilidad oral del fármaco hasta cerca del 25% gracias a la formación de nanopartículas formadas a través de la interacción entre la AmB y chitosán anfifílico modificado (GCPQ). La administración oral de esta formulación durante diez días consecutivos es eficaz frente a *Leishmania*, ya que permite acumular cantidad suficiente de AmB en los órganos diana (hígado y bazo), dando lugar a una reducción de la carga parasitaria en un 98.9 y un 92.1% respectivamente.

En conclusión, es necesario desarrollar estrategias que permitan mejorar tanto la solubilidad, biodisponibilidad y acumulación de AmB en los órganos diana en función del tipo de enfermedad a tratar, el perfil farmacocinético deseado y la vía de administración. La AmB poliagregada, el complejo AmB-CD y las nanopartículas formadas por la interacción de AmB-GCPQ han demostrado ser formulaciones fáciles de preparar, con un favorable balance beneficio/riesgo y una mejor relación coste-eficacia para el tratamiento de infecciones fúngicas y/o parasitarias para ser administradas por vía IV, ocular y oral respectivamente.

## SUMMARY

Amphotericin B (AmB) is a broad antifungal and antiparasitic drug, usually administered via intravenous infusion due to its low aqueous solubility and low oral absorption. AmB clinical use is limited by acute toxicity presenting as mostly as fever and gastrointestinal symptoms as well as chronic toxicity related to hemolysis and nephrotoxicity. Fungizone's low therapeutic index is responsible for its replacement by novel lipidic AmB formulations with a more favourable risk-benefit ratio and a very high cost which limit their use in developing countries. Thus, there is an increased need to engineer cost-effective and safe AmB formulations for the treatment of fungal and parasitic diseases.

Novel controlled release parenteral formulations were developed combining AmB loading in albumin microspheres, drug aggregation state (monomer, dimer and poly-aggregated) and particle size modifications in order to improve its efficacy/toxicity balance. Larger particle size and drug encapsulation in albumin microspheres showed a reduction in AmB hemolytic toxicity. Intravenous administration of poly-aggregates of AmB results in a short plasma half-life but a high AmB tissue accumulation characterized by a prolonged mean residence time of 65 h. Poly-aggregated AmB is a safe cost-effective alternative for the treatment of several diseases such as leishmaniasis where the parasites are accumulated intracellularly in macrophages of the reticulo-endothelial system.

Although there are significant advances in parenteral formulations of AmB, limited research is available on the development of non-invasive formulations. Ocular fungal infections are commonly treated with extemporaneous dilutions of Fungizone<sup>®</sup> which is effective but needs daily preparation and causes irritation. AmB-cyclodextrin (CD) formulation has shown to be suitable for the treatment of ocular fungal infections because it has an enhanced antifungal activity (30% higher than Fungizone<sup>®</sup>), can be easily prepared extemporaneously and maintains stable its antifungal activity and physicochemical characteristics over one month.

Similarly, no oral formulation of AmB is available for the treatment of systemic infections. A novel nanoparticulate formulation prepared via the interaction of AmB and quaternary ammonium glycol chitosan (GCPQ) was developed able to enhance the oral

durg bioavailability to ~25%. The oral administration of this formulation during ten consecutive days enabled the accumulation of high amounts of AmB in clinically relevant tissues such as liver and spleen and was shown to be able to reduce parasitic load by 98.9% and 92.1% respectively.

In conclusion, strategies to enhance the solubility, bioavailability and tissue accumulation of AmB need to be optimised depending on the disease state, desired pharmacokinetics and route of administration. In this thesis, we have demonstrated that poly-aggregated AmB, AmB-CD complexes and AmB-GCPQ nanoparticles are useful formulations for IV, ophthalmic and oral administration respectively able to overcome challenges related to the treatment of fungal infections or parasitic diseases such as visceral leishmaniasis providing easily prepared and cost-effective treatment alternatives with improved risk-benefit ratio.

Anfotericina características físico químicas  
biodistribución prolongada circulación  
AmBisome Fungizona anfotericina  
poliagregada **1. Introducción**

plasmática amplio volumen de distribución  
tamaño de partícula anfotericina B  
poliagregados sistema de retículo endotelial  
toxicidad hemolítica macrófagos *Leishmania*  
AmB Beagle shipotensión ciclo dextrinas  
chitosán modificado anfotericina poliagregada  
tamaño de partícula absorción oral  
toxicidad hemolítica biodistribución  
prolongada circulación plasmática  
amplio volumen de distribución tamaño de  
partícula anfotericina B poliagregados  
sistema de retículo endotelial toxicidad  
hemolítica macrófagos *Leis*





# 1. INTRODUCCIÓN

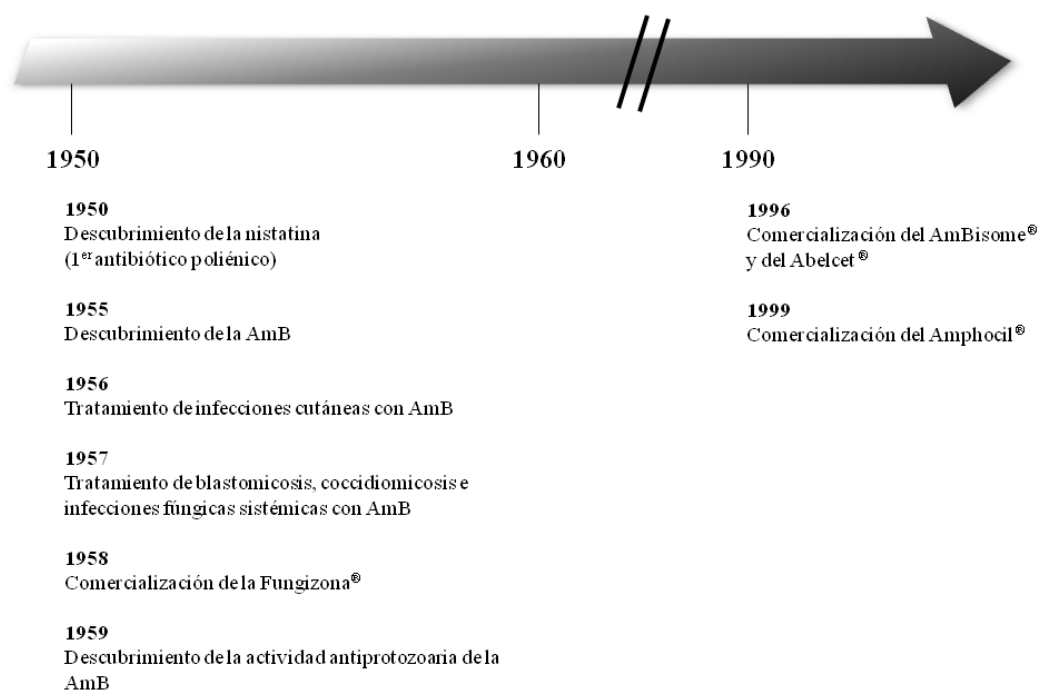
## 1.1. Anfotericina B

### 1.1.1. Antecedentes históricos

La AmB es un fármaco que pertenece a los grupos J02A (antimicóticos sistémicos) y A01A2 (antifúngicos bucales y gastrointestinales) [1]. Es un antibiótico poliénico de color amarillo-anaranjado, obtenido a nivel industrial a partir de determinadas cepas de *Streptomyces nosodus* [2]. Este microorganismo fue descubierto en 1955 en el delta del río Orinoco en Tembladora (Venezuela) por W. Gold et al., quienes evaluaron por primera vez las propiedades biológicas de la AmB [2, 3]. En 1956, se describe la utilización de AmB en humanos para el tratamiento de candidiasis cutáneas [4]. Sin embargo, el uso de AmB en humanos se generaliza en 1957, siendo utilizada para el tratamiento de otras enfermedades como la blastomycosis [5], coccidiomycosis [6] e infecciones fúngicas sistémicas [7]. El inicio de la era moderna de la terapia antifúngica viene marcado por el desarrollo de la Fungizona® (AmB), caracterizada por ser el primer antimicótico con amplio espectro de acción de administración sistémica, el cual fue comercializado por Bristol-Myers Squibb en 1958 [8]. Aunque la nistatina (Mycostatin®) fue el primer antifúngico utilizado en la práctica clínica, debido a su toxicidad por vía parenteral, su uso quedó limitado a infecciones fúngicas cutáneas [8]. La Fungizona® fue considerada durante varias décadas como fármaco de referencia (gold estándar) en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas [9, 10]. Sin embargo, su administración por vía intravenosa (IV) está asociada con graves problemas de nefrotoxicidad, que limitan considerablemente su uso en la práctica clínica [10, 11]. Han transcurrido más de tres décadas hasta que nuevas formulaciones lipídicas de AmB con mejores perfiles de seguridad que la Fungizona® han salido al mercado (Figura 1).

La Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) aprobó dos nuevos fármacos basados en formulaciones lipídicas de AmB en 1996 (AmBisome® y Abelcet®) y un tercer fármaco en 1999 (Amphocil® o también denominado Amphotec®) [12]. Aunque existe cierta controversia debido a la gran variabilidad de factores existentes en juego (como el tipo de infección a tratar u otras comorbilidades presentadas por el paciente), una gran parte de los estudios han demostrado que las

nuevas formulaciones lipídicas tienen una mayor o igual eficacia clínica y menor nefrotoxicidad que la Fungizona® [10, 11, 13, 14], si bien estas nuevas formulaciones son mucho más costosas que la Fungizona® [11, 13]. Sin embargo, teniendo en cuenta los costes sanitarios indirectos generados principalmente por problemas renales graves (que ocasionan un aumento de la tasa de morbilidad y prolongación del tiempo de hospitalización), hacen que las formulaciones lipídicas lleguen a ser coste-efectivas [11, 13].



**Figura 1. Eventos históricos claves en el desarrollo de la AmB**

Mientras que en los países en vías de desarrollo, la Fungizona® sigue siendo ampliamente utilizada, en los países desarrollados, las nuevas formulaciones lipídicas ocupan la primera línea de tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas quedando el uso de la Fungizona® relegado a un segundo plano [1, 15]. De hecho, desde mayo de 2012, la autorización de comercialización de la Fungizona® ha sido revocada por la AEMPS [12].

Además de la actividad antifúngica, ya a finales de la década de los 50, se descubrió que la AmB presentaba actividad frente a protozoos como *Leishmania* [16]. En la actualidad, la AmB liposomal (AmBisome®) además de los fármacos antimoniales (Glucantime®), son los tratamientos de elección frente a la leishmaniasis visceral en España [1].

## 1.1.2. Estructura y propiedades fisicoquímicas

### 1.1.2.1. Estructura

La AmB es el ácido (19E,21E,23E,25E,27E,29E,31E)-(1R,3S,5R,6R,9R,11R,15S,16R,17R,18S,33R,35S,36R,37S)-33[(3-amino-3,6-didesoxi-β-D-manopiranosil)oxi]-1,3,5,6,9,11,17,37-octahidroxi-15,16,18-trimetil-13-oxo-14,39-dioxabicyclo [33.3.1] -nonatriaconta-19,21,23,25,27,29,31-hepteno-36-carboxílico [17]. Su fórmula empírica es  $C_{47}H_{73}NO_{17}$  [17]. *Streptomyces nosodus* produce además de AmB, anfotericina A (AmA), la cual se caracteriza porque el doble enlace de la posición C28-C29 está reducido (Figura 2) [18]. Aunque ambas moléculas presentan una estructura química muy similar, la AmA tiene menor actividad biológica que la AmB [18]. Por esta razón, la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) exige que todo producto utilizado como AmB contenga un mínimo del 75% de esta molécula [19].

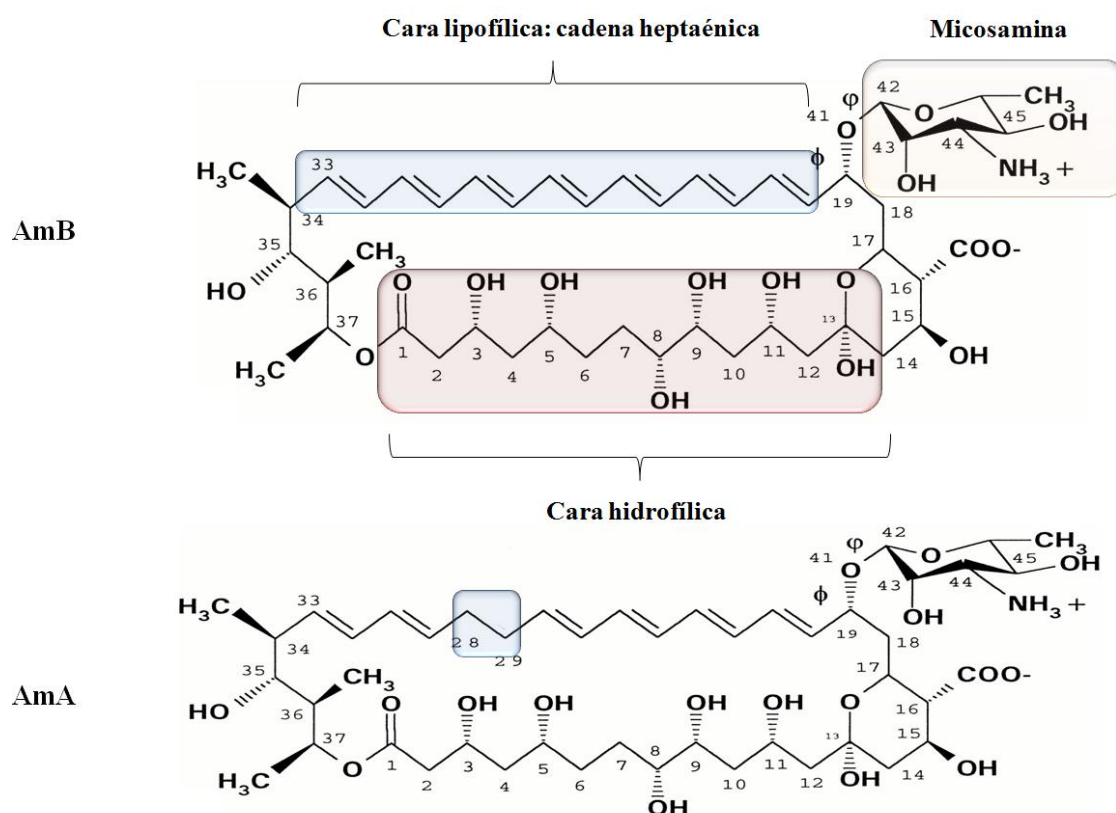


Figura 2. Estructura química de la AmB y AmA

El peso molecular de la AmB es de 924.08 g/mol [17]. Su estructura química se caracteriza por presentar un anillo macrocíclico con un grupo lactónico interno y un grupo cromóforo constituido por siete dobles enlaces conjugados que da lugar a su

espectro característico en la zona del ultravioleta/visible [20]. La AmB es una molécula anfifílica (o también denominado anfipática) caracterizada por presentar una cara lipofílica (hidrófoba) constituida por la cadena heptaénica que alarga la estructura del anillo macrocíclico y da rigidez a la molécula, y por una cara hidrofílica (polar) compuesta por siete grupos hidroxilo y un grupo éster. Además presenta un anillo interno tipo hemiacetal, el cual se encuentra en equilibrio con la forma cetónica abierta cuando la molécula está en solución [20].

La AmB es una molécula anfótera como su nombre indica, de manera que es capaz de comportarse tanto como ácido como base en función del pH del medio en la que se encuentre [20]. En el anillo macrocíclico presenta un ácido carboxílico y una cadena lateral de micosamina (aminodesoxihexosa) con un grupo amino primario. Tanto el grupo amino como el grupo carboxílico están ionizados a pH fisiológico, con valores de pKa de 10.0 y de 5.5 respectivamente [21]. Ambos grupos juegan un papel clave en la actividad biológica que tiene la AmB [22].

La síntesis química de la molécula completa fue descrita por Nicolaou et al., en 1987 [23]. Sin embargo, en la actualidad la síntesis de la AmB se lleva a cabo mediante producción biotecnológica, debido a la complejidad estructural de la molécula (con múltiples estereocentros, anillo macrocíclico y enlace beta-glicosídico) que provoca altos costes y bajo rendimiento [2].

#### **1.1.2.2. Solubilidad**

Como consecuencia de su naturaleza anfifílica y zwitteriónica y la distribución asimétrica de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, la AmB es una molécula muy poco soluble no solamente en solventes acuosos, sino también en la mayoría de los disolventes orgánicos [13, 20]. En la tabla 1, se describe la solubilidad de la AmB en diferentes solventes. La AmB en agua a pH fisiológico (pH 6 – 7) presenta una solubilidad inferior a 0.001 mg/mL [13]. Esta es una de las principales razones por las que la absorción oral de la AmB es mínima y por tanto, se tiene que administrar por vía parenteral. Cuando la AmB se encuentra en medios acuosos alcalinos (pH > 11) o ácidos (pH < 2), su solubilidad se ve incrementada considerablemente ( $\approx 0.1$  mg/mL) debido a la formación de sales, pero sin embargo, su acción antimicótica se ve reducida [2, 24]. Para incrementar la solubilidad de la AmB en agua, se pueden incorporar diferentes surfactantes en el medio, tales como, lauril sulfato sódico o desoxicolato

sódico [20]. Por ejemplo, la Fungizona<sup>®</sup>, fármaco de referencia de la terapia antifúngica, es una dispersión micelar de AmB en desoxicolato sódico [25].

**Tabla 1. Solubilidad de la AmB en diferentes solventes [13, 20, 24]**

Solvente	Solubilidad de la AmB (mg/mL)
Dimetilsulfóxido	30 - 40
Etilenglicol	2.6
Dimetilformamida	2 - 4
Metanol	2
Ácido acético	1 - 2
Propilenglicol	1 - 2
Etanol	0.5
Acetona	0.35
Alcohol isopropílico	0.11
Agua alcalina (pH > 11) o agua ácida (pH < 2)	0.1
Cloroformo	0.08
Ciclohexano	0.02
Éter de petróleo	0.01
Agua a pH fisiológico (pH 6-7)	< 0.001

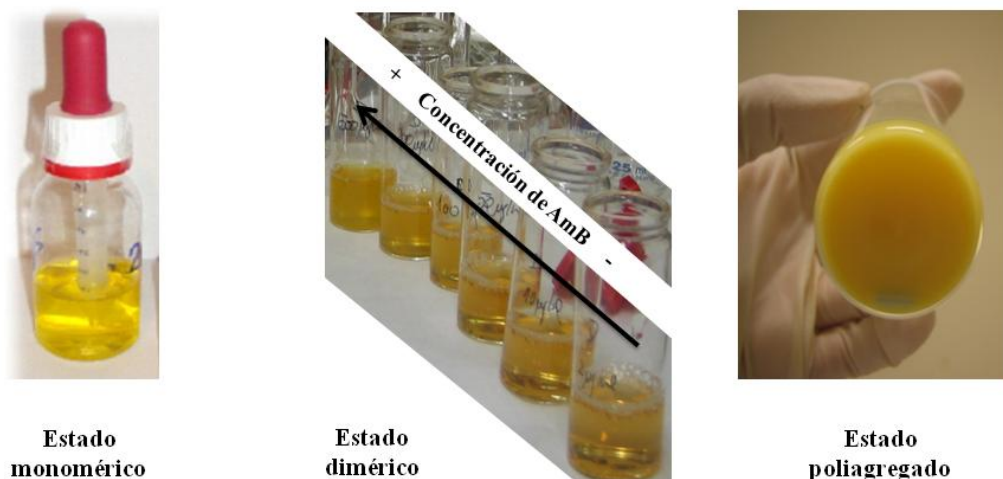
### 1.1.2.3. Estado de agregación

El estado de agregación de la AmB es un parámetro complejo ya que condiciona no solo la toxicidad sino también la actividad y la farmacocinética del fármaco [13]. Es un parámetro difícil de controlar, ya que en solución existe un complejo equilibrio entre las diferentes especies (monómero, dímero y poliagregado) el cual puede verse alterado cuando la formulación es diluida [26]. De manera que el estado de agregación de una determinada formulación de AmB puede ser modificado tras su administración *in vivo*, de ahí que sea esencial evaluar el efecto del estado de agregación con ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* [27].

En medios acuosos y a concentraciones muy bajas, la AmB se encuentra en estado monomérico. Sin embargo, debido a su naturaleza anfipática, la AmB tiende a agregarse en medios acuosos. La concentración crítica de agregación (CCA) de la AmB es de 1

$\mu\text{g/mL}$  ( $1 \mu\text{M}$ ) [28, 29]. La CCA determina la concentración mínima a partir de la cual las moléculas de AmB dejan de estar en estado monomérico y comienzan a formarse agregados micelares como consecuencia de la interacción hidrofóbica entre cadenas poliénicas de diferentes moléculas de AmB [2, 30]. A mayor concentración de AmB en el medio, aumenta no sólo el número de agregados, sino también el tamaño de los mismos [31]. Se han descrito agregados con un peso molecular próximo a  $2 \times 10^6$  en medios acuosos (con un pH de 7.9) con concentraciones de AmB entre  $10^{-4}$  -  $10^{-5}$  M y en presencia de desoxicolato sódico y sales fosfato [20, 32]. Teniendo en cuenta que el peso molecular de una molécula de AmB es de 924.08 g/mol, nos puede dar una idea del gran número de moléculas que pueden llegar a formar parte de los agregados (ej.  $2 \times 10^6 / 924.08 \approx 2164$  moléculas).

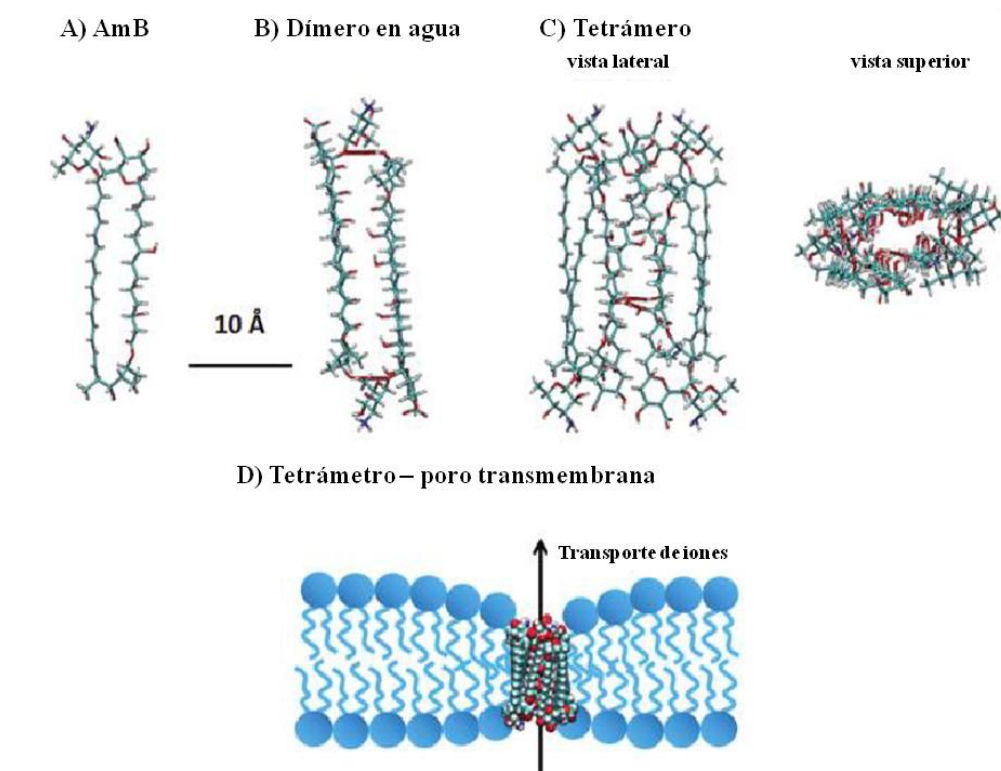
La AmB cuando se encuentra en estado monomérico da lugar a una disolución completamente transparente de color amarilla [13]. A medida que la concentración de moléculas de AmB en el medio acuoso se incrementa, empiezan a formarse agregados, también denominados dímeros u oligómeros, que dan lugar a una dispersión coloidal translúcida de color amarillo anaranjado [13]. Si se sigue incrementando la concentración de AmB, el grado de agregación de los oligómeros es mayor y se obtienen suspensiones opacas amarillentas (Figura 3).



**Figura 3. Apariencia física de los diferentes estados de agregación de la AmB en medio acuoso**

Uno de los modelos más recientes que intenta explicar cómo acontece el proceso de agregación de la AmB ha sido descrito por Wasko et al. [33] (Figura 4). Basándose en estudios previos de espectroscopía de fluorescencia llevados a cabo por otros autores [34], se calculó la distancia existente entre grupos cromóforos (cadena heptaénica)

vecinos dentro de la estructura de un agregado de AmB resultando ser 0.48 nm. Debido a que esta distancia es muy pequeña, los grupos con cargas eléctricas de la AmB se encuentran separados lo máximo posible con el fin de minimizar la energía del sistema. De manera que es bastante probable que en medios acuosos, las dos moléculas de AmB que componen un dímero se encuentren en un sentido antiparalelo una de otra [33] (Figura 4B). Estudios *in silico* previos llevados a cabo por Mazerski et al., corroboran esta estructura, mostrando que la máxima estabilidad en el dímero se obtiene cuando ambas moléculas se encuentran formando un ángulo de  $170^\circ$  y la distancia entre el centro de sus grupos cromóforos, al igual que el calculado mediante técnicas espectroscópicas es de 0.48 nm [35, 36].



**Figura 4. Modelo del proceso de agregación de la AmB (adaptado de [33])**

La estructura dimérica de la AmB se considera que queda estabilizada mediante: (i) interacciones hidrofóbicas (vía dipolo-dipolo) entre grupos cromóforos y (ii) puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo del C(35) y el oxígeno situado entre el C(42) y C(19) [36]. Posteriores estudios *in silico* han demostrado que los dímeros pueden asociarse fácilmente para dar lugar a tetrámeros por medio de la formación de puentes de hidrógeno entre los hidroxilos del C8 y el C3 (Figura 4C), originando una estructura elíptica (0.40 x 0.75 nm) con forma similar a los poros transmembrana que han sido

descritos como responsables del mecanismo de acción de la AmB (Figura 4D) [33]. Hay dos razones principales que corroboran la estructura del tetrámero: (i) los grupos polares de micosamina quedarían situados en los extremos del tetrámero estando separados por una distancia de 3.2 nm, que resulta muy similar al espesor de las membranas lipídicas y (ii) la superficie externa estaría constituida por las cadenas poliénicas hidrofóbicas las cuales pueden incorporarse más fácilmente en la membranas biológicas pero también pueden asociarse con otras cadenas poliénicas por medio de interacciones van der Waals dando lugar a agregados de mayor tamaño [33].

Existen una gran cantidad de parámetros que condicionan el estado de agregación de la AmB. Como se ha comentado anteriormente, un factor clave es la concentración de fármaco [37, 38], de manera que a concentraciones por debajo de la CCA, la AmB se encontrará en estado monomérico, y a concentraciones superiores comenzará a agregarse [29]. Pero además de la concentración, existen otra serie de parámetros críticos tales como el empleo de agentes surfactantes u otros excipientes [13, 29, 39]. Junto a lo anterior, el empleo de desoxicolato sódico como agente tensioactivo da lugar a formas agregadas, mientras que la utilización de gamma-ciclodextrina siempre que se mantenga una cierta proporción AmB: excipiente es capaz de formar complejos con la AmB en estado monomérico [27, 40-42]. Otros excipientes tales como la albúmina sérica son capaces de incrementar la CCA de la AmB. Aramwit et al., han demostrado que la CCA pasa de ser 1 a 8  $\mu$ M cuando la AmB se encuentra en un medio isotónico que contiene 4% p/v de albúmina [29].

Además de los excipientes, la temperatura puede originar un cambio en el estado de agregación de la AmB [43, 44]. Por ejemplo, someter la Fungizona<sup>®</sup> durante una hora a 70 °C de temperatura conduce a la formación de superagregados con un tamaño de partícula 13 veces superior al de la Fungizona<sup>®</sup> pero con una toxicidad hemolítica tres veces menor [27]. No se debe olvidar el efecto que tiene sobre el estado de agregación, la interacción de la AmB con el solvente en el que se encuentra. La AmB se halla en estado monomérico en solventes tales como el dimetilsulfóxido (DMSO), el cual es un solvente altamente polar capaz de formar numerosos puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo de la AmB. En medios acuosos a pH 7.4, predomina la AmB en forma agregada; sin embargo, si se añade metanol como cosolvente se promueve la transformación de los agregados insolubles a formas monoméricas solubles [13]. Lo mismo ocurre si se incrementa el pH del medio a pH 12, ya que la AmB al ser un



zwitterión, a pH alcalino posee carga negativa (debido a que los grupos carboxílicos estarán ionizados), de manera que la agregación se verá limitada por la repulsión electrostática entre los mismos [45].

Controlar el estado de agregación de la AmB es una tarea compleja, sin embargo es de suma importancia ya que condiciona la interacción con los esteroides de las membranas biológicas y por tanto la toxicidad y la actividad del fármaco [13]. La toxicidad de la AmB se debe a su interacción con el colesterol de las membranas biológicas de las células de mamíferos en vez de con el ergosterol de las células fúngicas y de los parásitos. Aunque existe controversia dentro de la comunidad científica, parece ser que la AmB en estado monomérico presenta mayor selectividad por el ergosterol en comparación con las formas agregadas [26, 46]. A concentraciones muy bajas en las que la AmB se encuentra completamente en forma monomérica, predomina la asociación con el ergosterol de las membranas biológicas que lleva a la formación de poros o canales que producen la muerte de las células fúngicas y parasitarias; sin embargo, cuando la concentración de AmB en el medio se incrementa (y empiezan a formarse agregados solubles o dímeros de AmB), se observa además la interacción con el colesterol de las membranas de células de mamíferos que igualmente se traduce en formación de poros o canales en las membranas biológicas que son los que dan lugar a problemas de toxicidad [38, 47].

Diferentes autores han llevado a cabo múltiples estudios para comparar la toxicidad de los diferentes estados de agregación de la AmB [13, 27, 48]. Los estudios *in vitro* que se realizan mayoritariamente para evaluar la toxicidad de la AmB son los estudios de toxicidad hemolítica. Espada et al., demostraron que la AmB en estado dimerico es más hemolítica que la AmB monomérica a las concentraciones de 10 y 40 µg/mL; sin embargo, a altas concentraciones (100 µg/mL), la AmB monomérica resultó ser la más hemolítica de las formulaciones comparadas [27]. Un punto importante a resaltar es la preparación de los distintos estados de agregación de la AmB. Para poder obtener formulaciones que contengan la AmB en forma de monómero, normalmente se utilizan bien solventes tales como el DMSO y metanol o excipientes tales como las ciclodextrinas. A la hora de comparar la toxicidad hemolítica, hay que tener en cuenta que la hemólisis es consecuencia no sólo del estado de agregación de la AmB sino también de los excipientes y solventes utilizados en su preparación [49, 50]. Cabe destacar que a pesar de que la AmB dimerica presenta una toxicidad hemolítica

importante, las formulaciones que contienen AmB en estado poliagregado (y por tanto con mayor tamaño de partícula) resultaron ser mucho menos tóxicas [27]. De hecho, se ha observado que existe una relación inversa entre el tamaño de partícula de los agregados de AmB y su toxicidad hemolítica [27, 51].

De la misma manera, el problema de los excipientes y solventes empleados en la preparación de los distintos estados de agregación de la AmB es un factor crítico cuando la toxicidad se compara por medio de estudios *in vivo*. Para estudiar la toxicidad aguda de los distintos estados de agregación de AmB, se evalúa la supervivencia de los animales tras la administración de las diferentes formulaciones de AmB por vía IV en bolus. En todos los casos, la AmB en forma dimérica resultó ser el estado de agregación más tóxico [27, 40, 41, 52, 53]. Según los resultados obtenidos por los diferentes autores, tras la administración IV de una dosis de 5 mg/kg de AmB dimérica, la tasa de supervivencia fue inferior al 50% [27, 41, 52, 53], mientras que tras la administración de 10 mg/kg de AmB monomérica, las tasas de supervivencia fueron del 100% [27] y en el caso de AmB poliagregada fueron toleradas dosis de hasta 40 mg/kg [27, 41, 53].

En lo que respecta a la actividad *in vitro- in vivo* de los distintos estados de agregación, se han llevado a cabo diferentes estudios en modelos frente a *Leishmania* y frente a *Candida*. No obstante, siendo una cuestión controvertida, parece que no hay diferencias significativas entre la actividad antifúngica y antiparasitaria de la AmB dimérica y monomérica [54, 55]; mientras que se ha demostrado que existe una reducción en la actividad cuando la AmB se encuentra en estado poliagregado [56, 57]. Sin embargo, esta menor actividad se puede ver compensada con un aumento de dosis sin llegar a producirse los efectos adversos de la AmB dimérica o monomérica [41, 58].

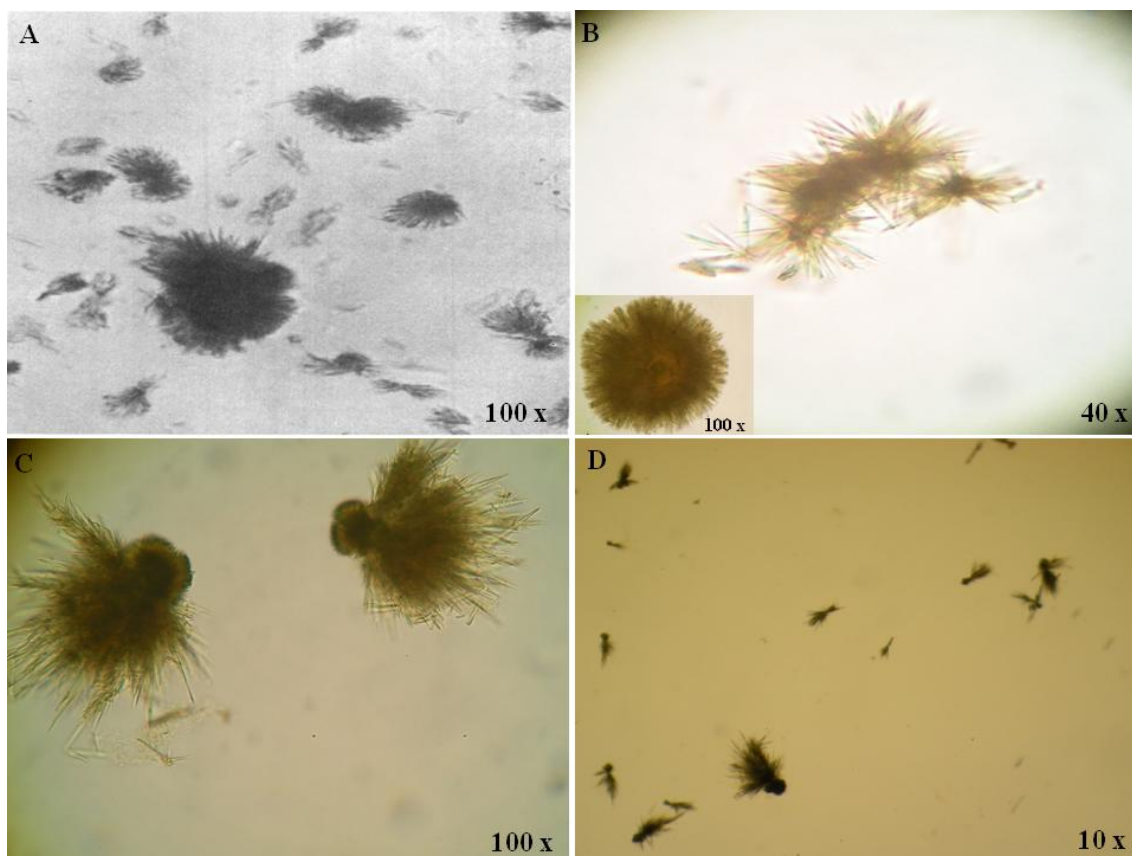
Por último es útil comentar, que el estado de agregación de la AmB condiciona en gran medida la distribución del fármaco en el organismo tras su administración IV. Cuando sistemas particulados son inyectados por vía IV, pueden ser reconocidos como agentes extraños siendo opsonizados por componentes plasmáticos [59]. Las partículas una vez opsonizadas, son fácilmente reconocibles por el sistema del retículo endotelial (SRE) también denominado sistema fagocítico mononuclear, de manera que los macrófagos (principalmente los del hígado, pero también los macrófagos alveolares y del bazo y otros macrófagos circulantes) son capaces de fagocitar las partículas opsonizadas, retirándolas así de la circulación plasmática pasando a ser acumuladas en tejidos [59,

60]. Este proceso de opsonización-fagocitosis está condicionado por las características que presentan las partículas; en general, a mayor tamaño de partícula, más eficiente es el proceso de opsonización, de manera que partículas con un tamaño inferior a los 200 nm suelen circular en plasma durante más tiempo [60]. Pero además del tamaño, la superficie de las partículas juega un papel clave en este proceso. Las partículas con una superficie más hidrofóbica son más eficientemente opsonizadas y posteriormente fagocitadas en comparación con las que presentan una superficie hidrofílica; de hecho en muchas ocasiones se utilizan polímeros hidrofílicos, como el polietilenglicol (PEG) para recubrir las partículas y así incrementar su circulación plasmática [60, 61].

La AmB en estado poliagregado tiene una serie de ventajas respecto a los otros estados de agregación cuando nos referimos al tratamiento de cierto tipo de enfermedades como la leishmaniasis visceral, la cual se caracteriza por una acumulación intracelular de parásitos dentro de los macrófagos principalmente localizados en hígado, bazo y médula ósea [62, 63]. La AmB en estado poliagregado al presentar un tamaño de partícula mayor, podría ser más fácilmente opsonizada y posteriormente fagocitada por los macrófagos del SRE siendo de esta manera vectorizada hasta los órganos diana [64]. Espada et al., han llevado a cabo estudios farmacocinéticos en roedores donde se comparaba la biodistribución de la AmB tras su administración IV, obteniéndose una mayor acumulación del fármaco poliagregado en bazo e hígado en comparación con la AmB dimérica [41].

#### **1.1.2.4. Morfología y tamaño**

El tamaño y la morfología de los agregados de AmB pueden ser estudiados mediante técnicas microscópicas. Debido a la baja solubilidad de la AmB en medios acuosos, los agregados formados presentan un tamaño relativamente grande, los cuales pueden ser observados mediante microscopía óptica (Figura 5). En todas las imágenes de la figura 5, se pueden apreciar fragmentos irregulares en forma de aguja o prisma cuyas dimensiones oscilan entre los 5-15  $\mu\text{m}$  de largo y menos de 0.3  $\mu\text{m}$  de diámetro [20]. Estos fragmentos tienden a agruparse en agregados de mayor tamaño dando lugar a “clusters” de unos 80  $\mu\text{m}$  de diámetro. Estas estructuras son características debido al proceso de recristalización durante la obtención del fármaco [20].



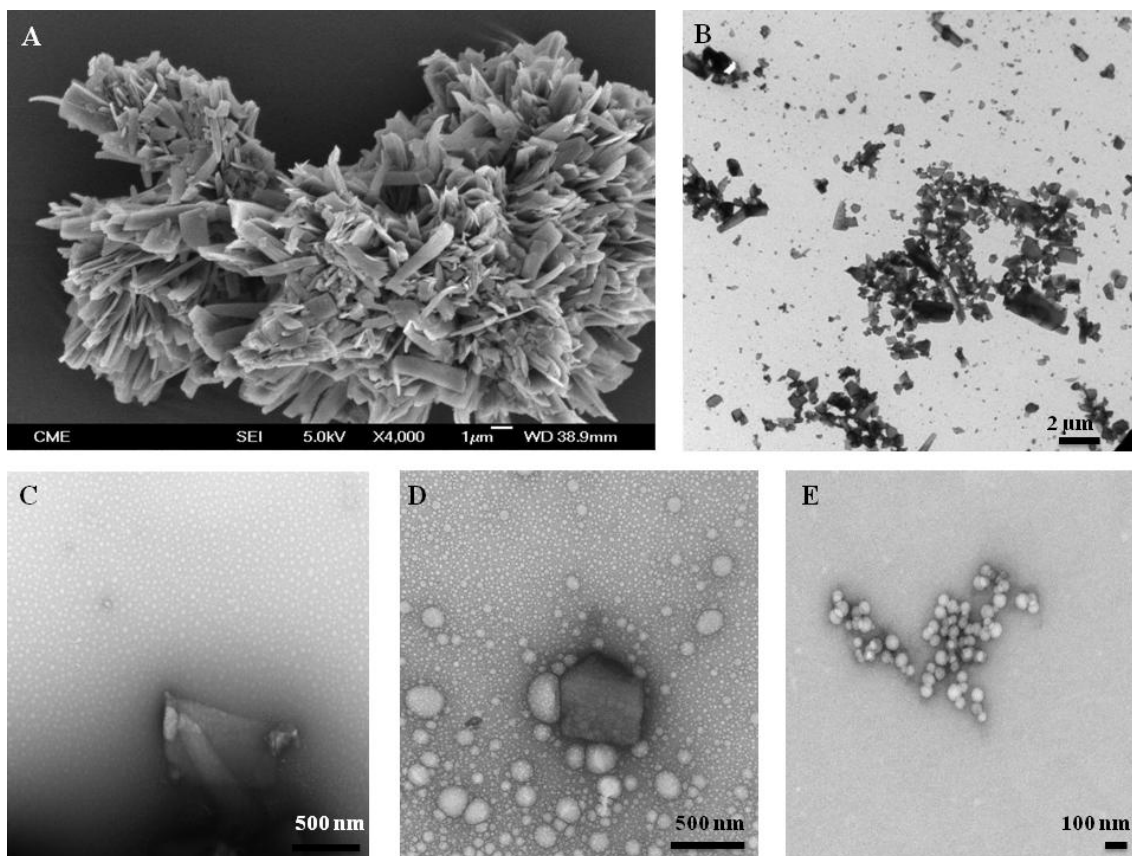
**Figura 5.** Imágenes de los agregados de AmB obtenidas mediante microscopía óptica: A) Estándar de AmB [20]; B) AmB en solución de DMSO/H<sub>2</sub>O (3:1); C) AmB en solución de DMSO/H<sub>2</sub>O (1:1); D) AmB en solución de DMSO/H<sub>2</sub>O (1:3). Ocular utilizado 10 x. El objetivo empleado se indica en cada imagen.

Sin embargo, con la resolución alcanzada con la microscopía óptica en el mejor de los casos se podría llegar a distinguir puntos separados de 0.25  $\mu\text{m}$  [65], de ahí que sea de poca utilidad en el campo de la nanotecnología. La resolución se incrementa enormemente con la microscopía electrónica, siendo en este caso un haz de electrones lo que interacciona con la muestra. La microscopía electrónica de barrido (scanning electron microscope; SEM) tiene una resolución de entre 1- 5 nm [66] y consiste en hacer incidir sobre la muestra, un haz de electrones acelerados a altas energías [65]. Una parte del haz incidente es adsorbido por la muestra y otra parte es transmitida en forma de electrones secundarios y elásticos, siendo los electrones secundarios los que se utilizan normalmente para la formación de la imagen [65]. Una de las ventajas del SEM es que el haz de electrones al ser más estrecho, las imágenes presentan una amplia profundidad de campo, con una apariencia tridimensional que resulta muy útil para el estudio de la morfología y la superficie del material [66]. Sin embargo, la principal desventaja es que la muestra en estudio tiene que ser metálica, por lo que es necesario recubrirla normalmente con una fina capa de oro u otro material conductor, para

proporcionarlas la conductividad eléctrica necesaria para dirigir los electrones a tierra y que no se queden acumulados en la superficie ya que distorsionarían la imagen [65]. Con todo, el mayor problema es que las imágenes obtenidas se alejan más de la realidad y durante este proceso se pueden generar artefactos en las muestras [67].

En el caso de la microscopía de transmisión electrónica (transmission electron microscope, TEM), la señal que se utiliza para formar la imagen es la que procede de los electrones transmitidos a través de la muestra. La resolución es aún mayor entre 1 - 2 Å (0.1 – 0.2 nm) [67], permitiendo estudiar la estructura interna del material además de su morfología y topografía [66]. En TEM, la energía del haz de electrones incidente tiene que ser muy alta (80 – 400 KV) por lo que en ocasiones puede dañar la muestra y el espesor de la misma se tiene que reducir lo máximo posible (100 – 200 Å) [65]. Con ambas técnicas de microscopía electrónica además podemos tener una idea del tamaño de partícula de nuestro material; sin embargo, hay que tener en cuenta que en ambos casos, al requerir que la muestra esté seca, no nos proporciona información sobre el tamaño hidrodinámico que tienen las partículas cuando se encuentran en soluciones acuosas a diferencia de otras técnicas como la espectroscopía de correlación fotónica [67].

La microscopía electrónica resulta de gran utilidad a la hora de estudiar la presencia de agregados de AmB en las formulaciones desarrolladas. La formación de cristales en forma de aguja o prisma es bastante característica. Las imágenes SEM nos da una visión tridimensional de los mismos (Figura 6A), mientras que las imágenes TEM son bidimensionales (Figura 6B). Como se ha comentado anteriormente, una de las ventajas de la microscopía de transmisión, es su mayor poder de resolución. De hecho, cuando la AmB se encuentra en soluciones acuosas existe un equilibrio entre la forma monomérica y las formas agregadas [32]. Al incrementar la resolución en TEM, se puede apreciar dicho equilibrio entre formas micelares y agregados (cristales) de mayor tamaño (Figura 6C). A la hora de desarrollar diferentes formulaciones galénicas, en algunos casos nos puede interesar controlar el grado de agregación del fármaco evitando la formación de grandes clusters (Figura 6D) o bien solubilizar o encapsular la AmB en diferentes sistemas (Figura 6E). La microscopía electrónica a pesar de las limitaciones que tiene, es una técnica sumamente útil a la hora de evaluar el grado de agregación de la AmB para poder comprender mejor cómo se comporta el fármaco en presencia de diferentes excipientes o sistemas farmacéuticos.



**Figura 6.** Imágenes de AmB obtenidas mediante microscopía electrónica: A) Imagen SEM (5.0 KV): AmB con desoxicolato sódico como excipiente (1:0.82); B) Imagen TEM (120.0 KV): AmB en dextrosa al 5%; C) Imagen TEM (120.0 KV): AmB en dextrosa al 5%; D) Imagen TEM (120.0 KV): AmB con polisorbato 80 y aceite de soja (1:1:5); E) Imagen TEM (120.0 KV): AmB con chitosán modificado (1:5). Acetato de uranilo al 1% como contraste negativo en TEM.

#### 1.1.2.5. Grado de cristalinidad

La AmB presenta una estructura cristalina que puede observarse en el análisis por difracción de rayos X (Figura 7A). Esta estructura cristalina puede verse afectada por varios factores; así por ejemplo, tras ser calentada a 158°C durante 15 minutos, se aprecia un cambio en el patrón obtenido por difracción de rayos X en donde los picos característicos del fármaco presentan una menor intensidad y además algunos están ligeramente desplazados en comparación a su valor inicial (Figura 7A). Estos cambios están relacionados con una pérdida de cristalinidad ( $\approx 30\%$ ) y un incremento en la forma amorfa de la AmB [20]. Cuando la AmB es sometida a otro tipo de procesos (pulverización), aparecen picos más anchos y de baja intensidad (Figura 7B), ésto implica que la mayor parte de la AmB ha experimentado un cambio de transición de estructura cristalina a amorfa [20].

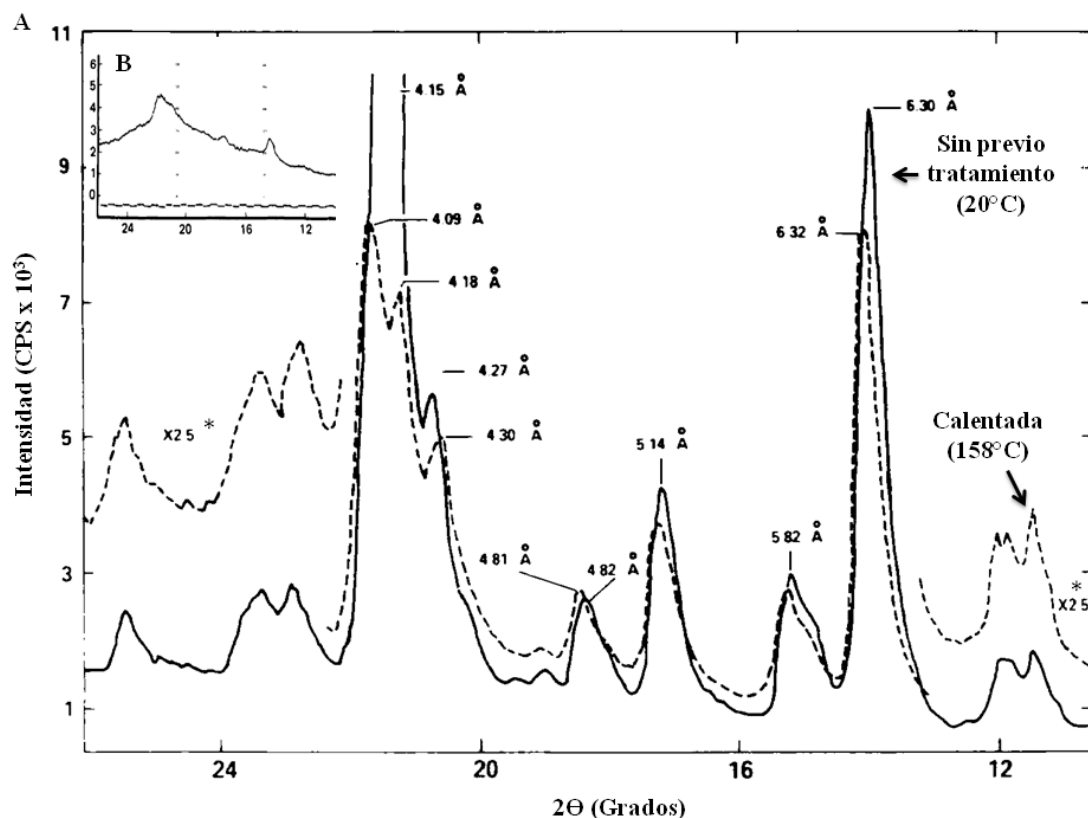


Figura 7. Análisis de la AmB por difracción de rayos X [68]: A) AmB en estado sólido sin ser sometida a ningún tipo de tratamiento (—); AmB calentada durante 15 minutos a 158°C (- - -); B) AmB pulverizada a temperatura ambiente, durante 3 minutos. La sección ampliada en  $4 \times 10^2$  cps está representada por \*.

El patrón obtenido por rayos X es único para cada fármaco y no solo nos aporta información muy útil acerca de la estructura (cristalina o amorfa), sino también nos permite detectar impurezas o identificar el fármaco en una mezcla con otros excipientes [69]. Además de la difracción por rayos X, existen otras técnicas para determinar si nuestro fármaco se encuentra en estado cristalino o amorfo, tales como la microscopía, la calorimetría diferencial de barrido, técnicas de infrarrojo o resonancia magnética nuclear [70]. Existen diferentes procedimientos que pueden favorecer la transición a forma amorfa, tales como la liofilización, la pulverización, la atomización (o spray-drying), la desecación en lecho fluido y la compresión entre otros [70]. En fármacos como la AmB, caracterizados por una solubilidad acuosa muy limitada, la obtención de formas amorfas sería ventajosa ya que son más solubles que las formas cristalinas [70]. Ahora bien, hay que tener en cuenta que las formas amorfas captan agua con mayor facilidad y esto puede dar lugar a mayores problemas de estabilidad físicoquímica y además son termodinámicamente menos estables que las formas cristalinas, de manera que pueden producirse procesos de recrystalización a lo largo del tiempo afectando la

solubilidad del fármaco [69], lo cual en última instancia podría traducirse en una menor biodisponibilidad oral o una menor actividad farmacológica.

#### **1.1.2.6. Estabilidad y conservación**

La AmB en estado sólido y a temperatura ambiente es estable durante largos periodos de tiempo [20]. Sin embargo, cuando la AmB en estado sólido se somete a altas temperaturas, se produce una pérdida de potencia; por ejemplo, la pérdida de potencia es del 17% cuando se expone a temperaturas de 105 °C durante 16 h, o la pérdida es aún mayor (21%), si se somete a temperaturas de 158 °C durante 15 minutos [20]. La estabilidad de la AmB en medio líquido es mucho menor. La AmB en tampón fosfato citrato es relativamente estable a un pH entre 5 y 7 y las soluciones de isopropanol/agua (1:1) a pH entre 6-8 son estables durante varios días [20]. Sin embargo, la estabilidad de la AmB es menor en medios acuosos a pH de 4 ó 10, y se degrada fácilmente a pH extremos (ej. pH 12) [20]. Al igual que en estado sólido, al incrementar la temperatura de las soluciones, la estabilidad de la AmB disminuye considerablemente (la cinética de degradación es el doble de rápida a 70 °C en soluciones acuosas a pH 7 que a 30 °C). Además de la temperatura y el pH, hay otros factores que influyen en la estabilidad físicoquímica de la AmB. La AmB es más estable en atmósferas sin oxígeno y sin luz [71], y también presenta una mayor estabilidad en estado líquido si el envase utilizado es de polipropileno en vez de cristal [72].

En lo que respecta a la estabilidad físicoquímica de los medicamentos comercializados con AmB, se puede destacar el hecho de que la mayoría son productos liofilizados (AmBisome<sup>®</sup>, Amphocil<sup>®</sup> y Fungizona<sup>®</sup>), y por tanto en estado sólido, que permite alargar el periodo de validez de dichos medicamentos hasta 2- 3 años (Tabla 2). El único medicamento que no es un producto liofilizado es el Abelcet<sup>®</sup>, de ahí que sea el que presente un periodo de validez ligeramente inferior en comparación a los otros (18-24 meses). El Abelcet<sup>®</sup> se basa en una suspensión lipídica de AmB (con un tamaño de partícula entre 1 – 10 µm [73]), y es por lo cual la estabilidad en medio líquido del fármaco se ha conseguido prolongar durante al menos 18 meses. En la tabla 2, se recoge la estabilidad de las formulaciones (que viene descrita en la ficha técnica de cada medicamento) una vez que el producto liofilizado ha sido reconstituido con agua estéril y después de la dilución con suero glucosado previa a su administración IV. Un punto importante a tener en cuenta es que en todos los medicamentos se hace mención



especial al hecho de que en ningún caso, las formulaciones deberían de ser reconstituidas o diluidas con soluciones salinas, ya que provocaría la precipitación del fármaco. Se ha demostrado que puede llegar a producirse una reducción del 25% de la actividad del fármaco en 4 horas [20].

**Tabla 2. Estabilidad fisicoquímica de los medicamentos comercializados con AmB [12]**

Medicamento (tipo de formulación)	Conservación (periodo de validez)	Diluyente	Reconstitución o dilución (V/V)	Concentración de AmB (mg/mL)	Máxima duración de almacenamiento a 2-8 °C	Máxima duración de almacenamiento a 25 ± 2 °C
AmBisome® (liposomas)	< 25 °C No congelar (36 meses)	Agua estéril para inyectables	Reconstitución inicial	4.0	7 días	24 horas
		Glucosa al 5%	Dilución 1 en 2	2.0	7 días	72 horas
			Dilución 1 en 8	0.5	7 días	72 horas
			Dilución 1 en 20	0.2	4 días	24 horas
		Glucosa al 10%	Dilución 1 en 2	2.0	48 horas	72 horas
Abelcet® (complejo lipídico)	2-8 °C No congelar (18 meses- viales de 10 mL 24 meses- viales de 20 mL)	Glucosa 5%	Dilución 1 en 5	1.0	48 horas	6 horas
Amphocil® (dispersión coloidal)	< 30 °C No congelar (24 meses)	Agua estéril para inyectables	Reconstitución inicial	5.0	24 horas	-
		Glucosa 5%	Dilución 1 en 8	0.625	24 horas	-
Fungizona® (dispersión micelar)	2-8 °C No congelar (24 meses)	Agua estéril para inyectables	Reconstitución inicial	5.0	7 días	24 horas
		Glucosa 5%	Dilución 1 en 50	0.1	-	-

Además hay que tener en cuenta que ninguno de los medicamentos contiene agente bacteriostático (principalmente debido a potenciales interacciones que pueden causar la precipitación del fármaco) y la AmB como tal, tiene actividad antifúngica pero no tiene actividad ni frente a virus ni bacterias. Por esta razón hay que prestar especial atención: (i) a que tanto la reconstitución como la dilución se lleven a cabo en condiciones asépticas controladas y (ii) el tiempo y las condiciones de almacenamiento previos a la administración. El almacenamiento entre 2-8 °C por lo general, prolonga la estabilidad del fármaco y además evita el crecimiento de microorganismos.

La formulación liposomal (AmBisome®) parece ser la más estable de todas tanto en el producto liofilizado como el producto reconstituido o diluido con suero glucosado. Cabe destacar que cuando la formulación se diluye con glucosa al 5% es más estable

que las diluidas con glucosa al 10 ó al 20% especialmente si se almacenan entre 2 y 8 °C, lo cual puede estar relacionado nuevamente con problemas de interacción y precipitación del fármaco con altas concentraciones de glucosa en el medio. No obstante, existen trabajos que demuestran que la estabilidad físicoquímica de la formulación liposomal es muy superior a la que viene indicada en la ficha técnica del medicamento. Morand et al., han demostrado que el AmBisome<sup>®</sup> una vez reconstituido en agua, mantiene su integridad tanto física como química durante un periodo de tiempo de 6 meses tanto a temperatura ambiente como entre 2 y 8 °C [74]. Sin embargo, al no contener ningún agente bacteriostático, uno de los principales riesgos sería la contaminación durante la manipulación del medicamento y el posterior desarrollo de microorganismos en medio acuoso. Teniendo en cuenta que se trata de formulaciones de administración parenteral, el riesgo se incrementa exponencialmente.

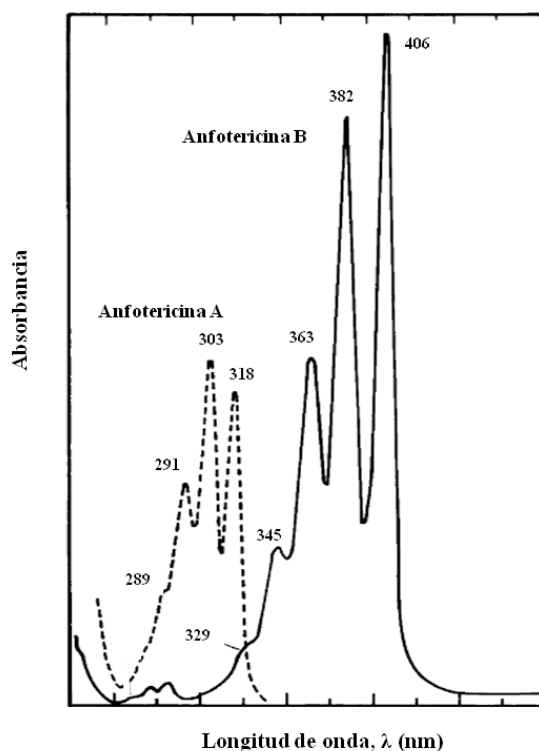
La estabilidad de las otras dos formulaciones lipídicas Abelcet<sup>®</sup> y Amphocil<sup>®</sup> es muy inferior en comparación con el AmBisome<sup>®</sup> o la Fungizona<sup>®</sup>. En cuanto al Abelcet<sup>®</sup>, aunque en la ficha técnica viene indicado un periodo de estabilidad de 48 horas a 2 – 8 °C y de 6 horas a temperatura ambiente, Vanneaux et al., han demostrado que tras su dilución en medio glucosado, la formulación es estable a ambas temperaturas durante al menos una semana [75]. En el caso del Amphocil<sup>®</sup>, llama la atención que en estado sólido es el más estable a altas temperaturas (30°C), mientras que una vez reconstituido tiene que ser usado dentro de las 24 horas siguientes. La mayor estabilidad en estado sólido podría estar relacionada con el hecho de que el Amphocil<sup>®</sup> tiene en su composición sulfato sódico de colesteroil como lípido principal, el cual tiene una mayor temperatura de transición de fase que la fosfatidil colina hidrogenada y el diestearoil fosfatidil glicerol (componentes lipídicos del AmBisome<sup>®</sup>) [76, 77].

### **1.1.3. Propiedades espectroscópicas**

#### **1.1.3.1. Espectroscopía Ultravioleta-Visible**

El grupo cromóforo de la AmB constituido por siete dobles enlaces conjugados juega un papel clave en las propiedades espectroscópicas de la molécula. Los dobles enlaces conjugados dan lugar a un alto grado de deslocalización de los electrones, con la consiguiente reducción de la energía requerida para una transición de electrones entre los orbitales moleculares  $\pi$  (enlazante y de menor energía) –  $\pi^*$  (antienlazante) [78]. Cuanto mayor es el número de enlaces conjugados, menor es la energía de excitación

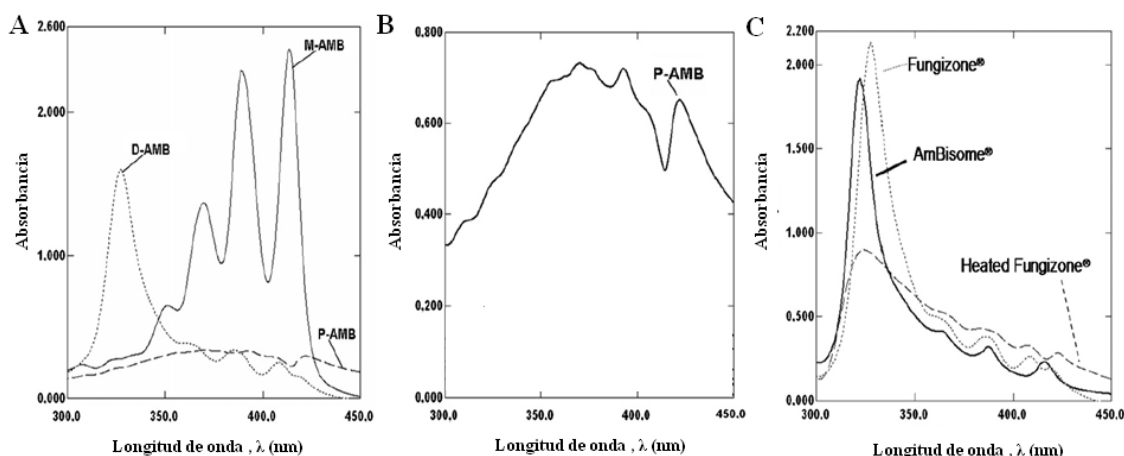
necesaria para producir la transición electrónica, de ahí que los picos de máxima absorción de la AmB se encuentren desplazados a mayores longitudes de onda en comparación con moléculas que contienen menor número de dobles enlaces conjugados [79]. Por consiguiente, la AmA al carecer de un doble enlace, no tiene los siete dobles enlaces conjugados como la AmB (Figura 2), de manera que aunque presente el mismo número de picos de máxima absorción, estos presentan menor intensidad y se encuentran a menores longitudes de onda en comparación con los de la AmB (Figura 8).



**Figura 8.** Espectro de absorción en el UV-visible de la AmB y de la AmA, ambas disueltas en un mezcla de DMSO y metanol a concentraciones de 5.45 y 8.32  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente [20].

Cuando se emplean disolventes polares para solubilizar la molécula se produce un desplazamiento batocrómico (es decir un incremento en las longitudes de onda de máxima absorción), debido a que el estado excitado es más polar, es más estable y se requiere menos energía para la transición electrónica entre orbitales [79].

Los estudios de espectroscopía de absorción en el UV-Visible resultan de gran utilidad a la hora de estudiar los distintos estados de agregación de la AmB, ya que presentan un espectro de absorción característico (Figura 9A) con diferentes bandas de máxima absorción (Tabla 3).



**Figura 9.** Espectro de absorción en el UV-Visible de la AmB [27]; A) Espectro de absorción de los diferentes estados de agregación: monómero ó M-AMB (—), dímero ó D-AMB (····) y poliagregado ó P-AMB (- - -); B) Espectro de absorción de la AmB en estado poliagregado (P-AMB); C) Estado de agregación de diferentes formulaciones de AmB: AmBisome® (—), Fungizone® (····) y Fungizone® calentada (- - -).

El espectro de absorción de la AmB en estado monomérico (ej. AmB solubilizada en solventes orgánicos como DMSO o metanol o a concentraciones muy bajas por debajo de la CCA) se caracteriza por presentar cuatro picos de máxima absorción a las longitudes de onda siguientes: (i) 406 – 412 nm; (ii) 383 – 388 nm; (iii) 363 – 368 nm; (iv) 344 – 350 nm (Tabla 3) [13, 80, 81].

Cuando la AmB empieza a agregarse y pasa de estado monomérico a estado dimérico, se observa un profundo cambio en su espectro de absorción (Figura 9A). Por un lado, tiene lugar un desplazamiento hipsocrómico de la banda situada a los 344 – 350 nm hacia longitudes de onda menores, apareciendo un banda de máxima absorción muy intensa (efecto hipercrómico) entre los 328 – 340 nm [82]; además se puede apreciar un efecto hipocrómico (disminución de la absorbancia) en las bandas localizadas a los 363-368, 383-388 y 406-412 nm así como un efecto batocrómico debido a la nueva banda de absorción entre los 415 – 425 nm [82].

Durante el proceso de agregación, los grupos cromóforos interaccionan entre sí por medio de fuerzas hidrofóbicas de manera que los niveles de energía se ven alterados [78, 83]. Cuando se forman agregados de mayor tamaño (poliagregados), la interacción hidrofóbica entre los grupos cromóforos es aún mayor y trae consigo un efecto hipocrómico notable en las bandas de máxima absorción localizadas a los 360-363, 383-385 y 406-420 nm (Figura 9B) [13].

**Tabla 3. Diferentes estados de agregación, sinónimos, longitudes de onda de máxima absorción y ratio entre la absorbancia del primer ( $\lambda_1$ ) y del último pico de absorción ( $\lambda_4$ ) [13, 52, 80, 81]**

Estado de agregación	Sinónimos	Abreviatura	Longitud de onda de máxima absorción (nm)	Ratio Abs $\lambda_1$ / Abs $\lambda_4$
Monómero	-	M-AMB	344 - 350 363 - 368 382 - 388 406 - 412	$\leq 0.25$
Oligómero	Dímero, agregados solubles en agua	D-AMB	328-340 363 - 368 382 - 388 406 - 412 415 - 425	$\geq 2$
Agregado de oligómeros	Poliagregados, multiagregados, superagregados, agregados insolubles en agua	P-AMB	360-363 382-385 406-420	-

Aunque existe cierta discrepancia sobre las longitudes de onda de máxima absorción, se puede comparar el estado de agregación entre unas formulaciones y otras calculando el ratio entre los valores de absorbancia del primer pico (menor longitud de onda) y los valores de absorbancia del último pico (mayor longitud de onda) [52]. De manera que, cuando predomina la AmB en forma monomérica, el ratio entre las absorbancias ( $\lambda_{344-350} / \lambda_{406-412}$ ) tiene un valor inferior a 0.25, mientras que cuando predomina la AmB en estado dimérico, el ratio de absorbancias ( $\lambda_{328-340} / \lambda_{415-425}$ ) presenta un valor muy alto igual o superior a 2 [52]. Sin embargo, este método para evaluar el estado de agregación tiene ciertas limitaciones cuando se trata de formas poliagregadas.

En la figura 8C, se puede observar como el espectro de absorción de formulaciones comerciales tales como el AmBisome<sup>®</sup> o la Fungizona<sup>®</sup> es bastante similar estando caracterizado por presentar AmB en forma dimérica (aunque con un ligero desplazamiento del máximo de absorción hacia longitudes de onda menores en el caso del AmBisome<sup>®</sup>). Cabe destacar, que el producto obtenido tras el calentamiento (durante 1 h a 70 °C) de la Fungizona<sup>®</sup> sufre un desplazamiento hipsocrómico e hipocrómico en su espectro de absorción, ya que la temperatura induce la formación de superagregados de AmB [27, 57].

### 1.1.3.2. Espectroscopía infrarroja

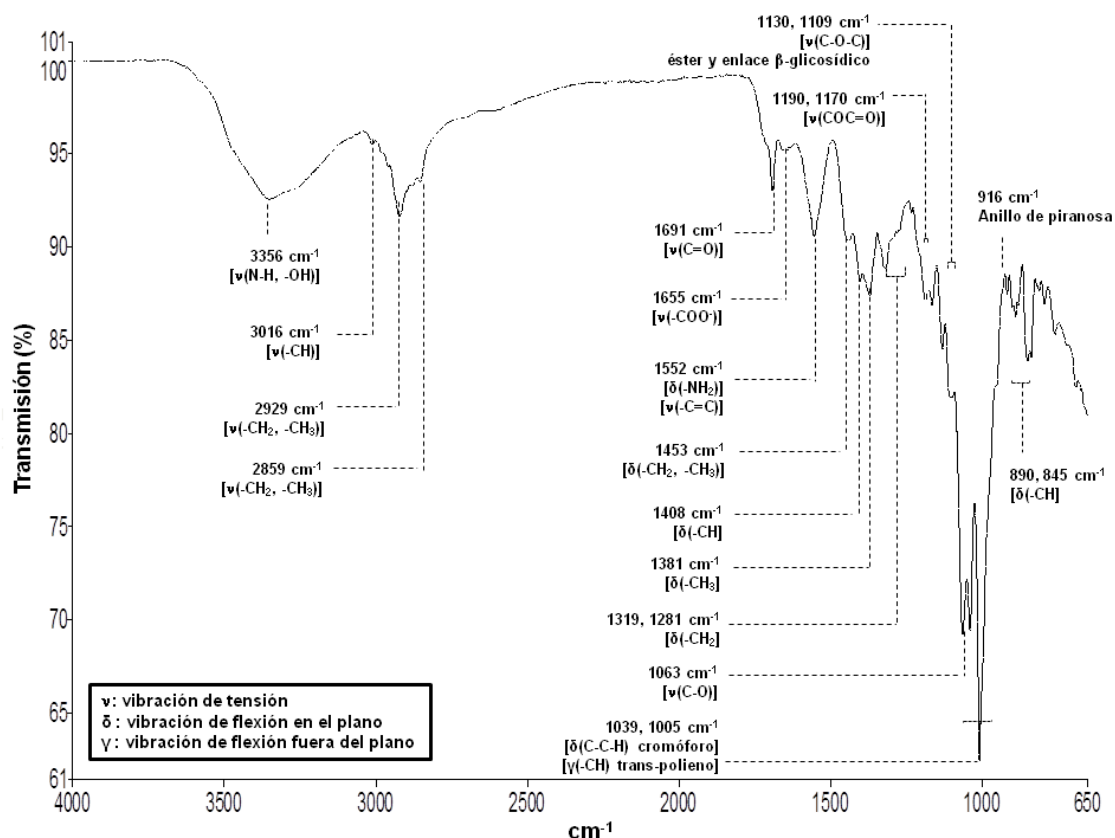
La espectroscopía infrarroja se basa en la absorción de la radiación infrarroja por las moléculas en vibración; de manera que, una molécula absorberá energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la energía necesaria para que se

produzca una transición vibracional de la molécula. Gracias a la energía proporcionada mediante luz infrarroja, las moléculas empiezan a vibrar de una manera determinada, pudiendo distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión.

Sin embargo, no todas las vibraciones y rotaciones de una molécula producen una absorción de radiación incidente; solamente serán activos al infrarrojo aquellos modos vibracionales y rotacionales de la molécula con momento bipolar diferente de cero o aquellos que induzcan un momento diferente de cero en la molécula. Todas las moléculas (excepto las especies diatómicas homonucleares como el O<sub>2</sub>) presentan un espectro infrarrojo característico, denominado huella dactilar [84], lo que permite identificar a cada sustancia por su espectro infrarrojo.

Los espectros muestran bandas que son típicas de grupos funcionales particulares y que tienen localizaciones e intensidades específicas dentro del espectro infrarrojo. Una de las principales aplicaciones de esta técnica en el campo de la tecnología farmacéutica es que nos permite inferir las estructuras moleculares de la sustancia analizada, por lo que resulta de gran utilidad a la hora de estudiar las interacciones existentes entre diferentes compuestos en una misma formulación. Las intensidades en las bandas del espectro de una mezcla, son generalmente proporcionales a las concentraciones de los componentes individuales [85], por lo que se puede evaluar si tras la mezcla entre diferentes compuestos (ej. fármaco y excipientes) aparecen nuevas bandas o se mantienen las bandas de los compuestos originales en el espectro infrarrojo.

En la figura 10, se describen los picos principales del espectro de absorción infrarroja de la AmB. Cabe destacar las picos localizados a 1691 y 1552 cm<sup>-1</sup> correspondientes con las vibraciones de tensión del enlace C=O del ácido carboxílico y las vibraciones de flexión del grupo amino, ya que ambos grupos funcionales juegan un papel clave tanto en las propiedades fisicoquímicas como en las propiedades farmacológicas de la AmB.



**Figura 10.** Espectro de infrarrojo de la AmB. Espectro de absorción infrarroja desde los 4000 hasta los 650 cm<sup>-1</sup> utilizando un espectrofotómetro (Perkin-Elmer Spectrum 100) con accesorio HATR (Horizontal Attenuated Total Reflectance). Muestra en estado sólido colocada directamente sobre el cristal de seleniuro de Zinc del accesorio de HTAR del espectrofotómetro.

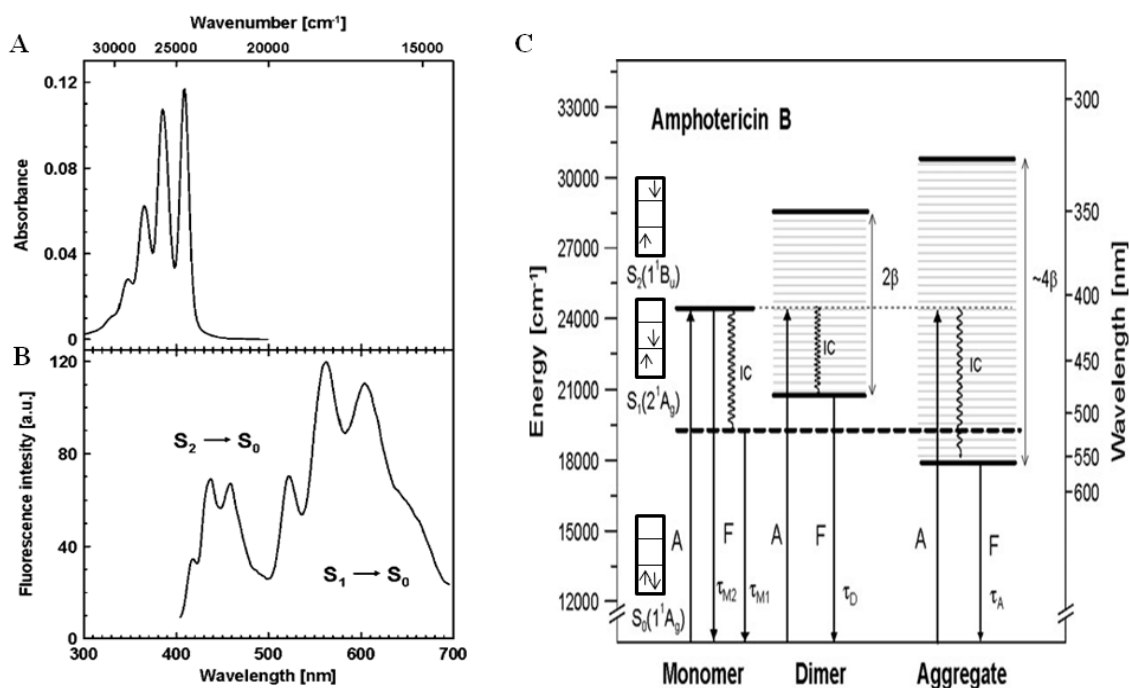
### 1.1.3.3. Espectroscopía de fluorescencia

Una de las ventajas que tiene la espectroscopía de fluorescencia respecto a la de UV-visible es que es capaz de identificar los diferentes estados de agregación a concentraciones mayores de AmB ya que permite separar la señal emitida entre los tres estados de agregación evitando fenómenos de superposición entre formas agregadas y monoméricas [33]. Además esta técnica resulta muy útil a la hora de evaluar la unión de la AmB a membranas biológicas así como su disposición [83].

Al igual que en la espectroscopía de UV-Visible, el grupo constituido por los siete dobles enlaces conjugados (fluoróforo), juega un papel muy importante en la espectroscopía de fluorescencia [83]. Cuando la AmB se irradia con la energía adecuada, se absorbe dicha energía y se produce una transición electrónica desde el estado fundamental donde los electrones ocupan los orbitales de mínima energía ( $S_0$ , con dos electrones con espines apareados) a un estado excitado ( $S_2$ , con dos electrones con espines desapareados) (Figura 11). Cuando la molécula se encuentra en el estado

excitado, debido a los choques con las moléculas del disolvente, parte de la energía en exceso se pierde y la molécula se relaja al nivel vibracional más bajo del estado excitado ( $S_1$ ). Pero además, tanto desde el estado excitado  $S_1$  o  $S_2$ , puede producirse el regreso a un nivel vibracional excitado del estado fundamental ( $S_0$ ) mediante una emisión de radiación electromagnética, que es a lo que se denomina fluorescencia [86].

El espectro de emisión de la fluorescencia de la AmB tiene dos bandas características: una de ellas se corresponde con la transición del estado  $S_2$  al  $S_0$  (entre los 400 - 500 nm) y la segunda banda corresponde a la transición del estado  $S_1$  al  $S_0$  (entre 500 - 700 nm) [83]. Así como el espectro de emisión de fluorescencia de los diferentes estados de agregación de la AmB están superpuestos, resultando complejo su diferenciación, el tiempo de vida ( $\tau$ , tiempo de vida media del estado singlete excitado) de fluorescencia es característico para cada estado de agregación (Figura 11C) [87].



**Figura 11.** A) Espectro de absorción de la AmB en estado monomérico en una mezcla de 2-propanol: agua (40:60); B) Espectro de emisión de fluorescencia de la AmB en estado monomérico en una mezcla de 2-propanol: agua (40:60); C) Diagrama de los niveles de energía de los diferentes estados de agregación de la AmB. Clave: A – absorción, F – fluorescencia, IC – conversión interna,  $\beta$  – parámetro de interacción dipolo-dipolo,  $\tau$  – tiempo de vida de fluorescencia,  $S_0(1^1A_g)$  – estado fundamental,  $S_1(2^1A_g)$  – primer estado excitado singlete,  $S_2(1^1B_u)$  – segundo estado excitado singlete [83].

El estado monomérico se caracteriza por un tiempo de vida del estado excitado  $S_2$  ( $\tau_{M2}$ ) inferior a 10 picosegundos y por un tiempo de vida del estado excitado  $S_1$  ( $\tau_{M1}$ ) de 0.36 nanosegundos. En el caso de la AmB dimérica, el tiempo de vida del estado excitado



( $\tau_D$ ) es de 14 ns y el estado poliagregado se caracteriza por un tiempo de vida ( $\tau_A$ ) de 3.5 ns. En base a estas diferencias en el tiempo de vida de fluorescencia, ha sido posible caracterizar la disposición molecular de la AmB en las membranas biológicas. Según estudios llevados a cabo por Gruszecki et al., en presencia de membranas con colesterol, es la forma agregada la que predominaría, mientras que en membranas con ergosterol, la AmB se encontraría principalmente en forma monomérica y dimérica [87].

#### **1.1.4. Propiedades farmacológicas**

##### **1.1.4.1. Mecanismo de acción**

A pesar de que el mecanismo de acción de la AmB no ha sido aún completamente elucidado, parece que la acción de la AmB tiene lugar a dos niveles diferentes (Figura 12):

1. Uniéndose al ergosterol dando lugar a la formación de poros o bien “secuestrando” el ergosterol de la membrana celular
2. Induciendo estrés oxidativo celular.

La AmB ejerce su actividad a dos niveles: uno sobre la membrana celular y otro a nivel intracelular. A nivel de la membrana celular, la AmB tiene la capacidad de unirse al ergosterol (1) y formar poros, o bien directamente “secuestrar” el ergosterol (2) desestabilizando la membrana celular. A nivel intracelular, la AmB puede producir estrés oxidativo. Aunque en la actualidad el mecanismo de inducción de estrés oxidativo es desconocido, se han propuesto diversas hipótesis tales como que la AmB puede comportarse como un agente pro-oxidante (3) generando especies de oxígeno altamente reactivas (ROS). Sin embargo, probablemente, se requiera una previa unión al ergosterol de la membrana para que pueda tener lugar este efecto (4). Por otro lado, las ROS son productos que se forman en la cadena respiratoria y por lo tanto, no podría descartarse el hecho de que la AmB ejerciera un determinado efecto sobre la actividad mitocondrial de la célula (5), contribuyendo de esta manera al estrés oxidativo. En última instancia, la acumulación de radicales libres provocaría un daño en los principales componentes celulares (ADN, proteínas y mitocondrias) produciendo la muerte celular.

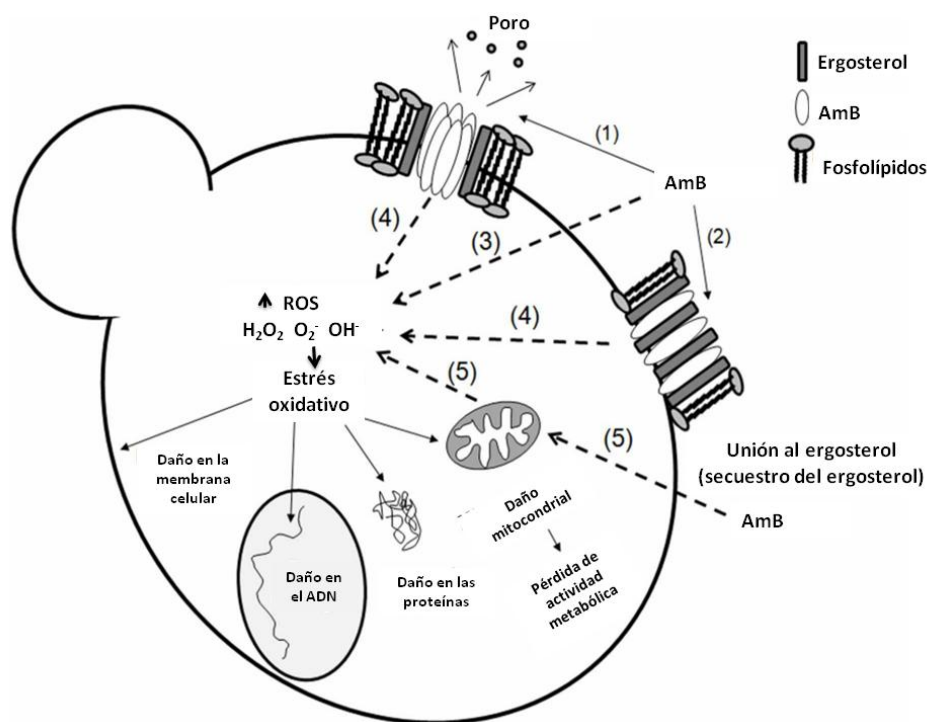


Figura 12. Mecanismo de acción de la AmB (adaptado de [88]).

### Efecto sobre la membrana celular

La AmB tiene la capacidad de insertarse en la bicapa de fosfolípidos de las células fúngicas y parasitarias, y unirse al ergosterol gracias a la parte hidrofóbica de la molécula (la cadena poliénica) [89], dando lugar a la formación de una serie de poros que incrementan la permeabilidad de la membrana a pequeños cationes tales como  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , promoviendo de esta manera una rápida depleción de iones intracelulares que traen consigo la muerte celular [90].

Pero además del ergosterol, la AmB puede unirse a otros esteroides tales como el colesterol, y aunque con menor afinidad, esta es la causa de los efectos adversos y la toxicidad de esta molécula [91]. Recientemente, se ha propuesto que la AmB puede llevar a cabo su acción por medio de dos vías diferentes: (1) uniéndose a los esteroides formando un poro (incrementado la permeabilidad de la membrana celular a cationes intracelulares) o (2) “secuestrando” a los esteroides, alterando la estabilidad de la membrana celular [92]. En este sentido, se ha propuesto que el “secuestro” de colesterol en las células del hospedador, aunque se relacione con la toxicidad de la AmB, podría resultar beneficioso en cierto tipo de infecciones como la leishmaniasis visceral ya que evitaría la interacción macrófago-parásito y en última instancia la infección de los macrófagos y posterior desarrollo de la enfermedad [93].

La AmB, según el momento y la especificidad por el sustrato, puede formar dos tipos de poros, acuosos y no acuosos, los cuales tienen unas repercusiones diferentes [88]. Una vez que la AmB entra en contacto con las células, el primer tipo de poros que se formaría serían los poros no acuosos, que se caracterizan por ser permeables a los cationes monovalentes pero poco permeables a los aniones monovalentes [94]. A continuación, se formarían los poros acuosos caracterizados por ser permeables tanto a cationes como a aniones monovalentes y también a otras moléculas de mayor tamaño como la glucosa [95, 96]. El proceso de formación de poros es muy rápido, de hecho tiene lugar en milisegundos [88]. Aunque la AmB tenga afinidad tanto por el ergosterol como por el colesterol, en ciertas ocasiones el proceso de formación de poros puede ser más lento como por ejemplo, cuando se encuentra encapsulada dentro de liposomas [97].

El contenido de ergosterol y colesterol de la membrana celular, repercute también en el tipo de poros que se forman [97]. El ergosterol es necesario en una gran cantidad de procesos celulares tales como: endocitosis, fusión de vacuolas y estabilización de proteínas [98]. Esto hace que la unión de la AmB al ergosterol, tenga repercusiones en todos los niveles en los que el ergosterol se encuentre implicado. De hecho, la formación de poros es un mecanismo que mejora la actividad de la molécula, pero no es requisito indispensable para producir la muerte celular [99]. Se ha observado que derivados químicos de la AmB cuya capacidad para formar poros se ve comprometida, sin embargo, no alteran su actividad antifúngica y antiparasitaria [100]. En este mismo sentido, otros polienos como la natamicina cuyo mecanismo de acción no está relacionado con la formación de poros, mantienen su actividad antifúngica [101].

### **Inducción de estrés oxidativo**

Además del aumento de la permeabilidad celular, numerosos estudios parecen indicar que no es el único mecanismo de acción responsable de producir la muerte celular. Ya en la década de los 80, diversos autores pusieron de manifiesto que no existía una correlación entre el grado de muerte celular que producían diversos fármacos poliénicos sobre *C. albicans* y la cantidad de  $K^+$  liberado por dichas células fúngicas [102, 103]. Si la formación de poros fuese el único mecanismo implicado, a mayor número de poros formados, mayor sería la liberación de  $K^+$  por parte de las células dando lugar a un mayor grado de muerte celular.

El efecto que ejerce la AmB es bastante complejo, ya que depende de diferentes factores biológicos tales como la fase de crecimiento del hongo/parásito [104, 105] y la presencia de oxígeno [103, 106], lo que sugiere que el mecanismo de acción de esta molécula va más allá de la interacción con los esteroides de la membrana celular y la formación de poros.

Se ha observado que la adición de sustancias capaces de eliminar radicales libres (tales como la superóxido dismutasa o la catalasa) protegen a las células fúngicas del efecto lítico de la AmB [103]. Pero además, Liu et al., han puesto de manifiesto que la AmB es capaz de actuar no sólo a nivel de la expresión de los genes implicados en la síntesis del ergosterol sino que también es capaz de inducir la expresión de genes relacionados con el estrés celular [107]. Por lo tanto y aunque el mecanismo no esté aún perfectamente elucidado, parece ser que la AmB (la cual es capaz de autooxidarse) puede inducir estrés oxidativo en las células fúngicas consecuencia de un aumento en la generación de radicales libres produciendo un daño en los principales componentes celulares (ADN, proteínas y mitocondrias) [103, 108, 109]. El daño oxidativo causado por la AmB en células fúngicas, también se ha observado que tiene lugar en parásitos [88, 110].

### **Propiedades inmunomoduladoras**

Además del efecto directo sobre las células fúngicas y parasitarias, la AmB tiene propiedades inmunomoduladoras sobre las células del hospedador, lo que constituye un arma de doble filo, ya que por un lado puede mejorar la respuesta inmunitaria del hospedador, y por otro puede acentuar la toxicidad del fármaco [88].

Si bien el mecanismo por el cual la AmB tiene propiedades inmunomoduladoras no está totalmente elucidado por el momento, parece ser que el fármaco es capaz de interaccionar con receptores tipo toll (TLR) y CD14 [88]. Los TLR pertenecen a una familia de proteínas transmembrana que forman parte del sistema inmunitario innato capaces de reconocer patrones moleculares expresados por un amplio espectro de agentes infecciosos. En particular, los TLR-2 presentan afinidad por bacterias Gram-positivas, peptidoglicano, ácido lipoteicoico y zimosán, mientras que los TLR-4 reconocen entre otros al lipopolisacárido de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, al Taxol y la cápsula polisacáridica de *Cryptococcus neoformans* [88, 111, 112]. La AmB se puede unir a los TLR-2 dando lugar a la liberación de citoquinas

proinflamatorias o bien a los receptores TLR-4 relacionados con la producción de citoquinas antiinflamatorias [113] (Figura 13).

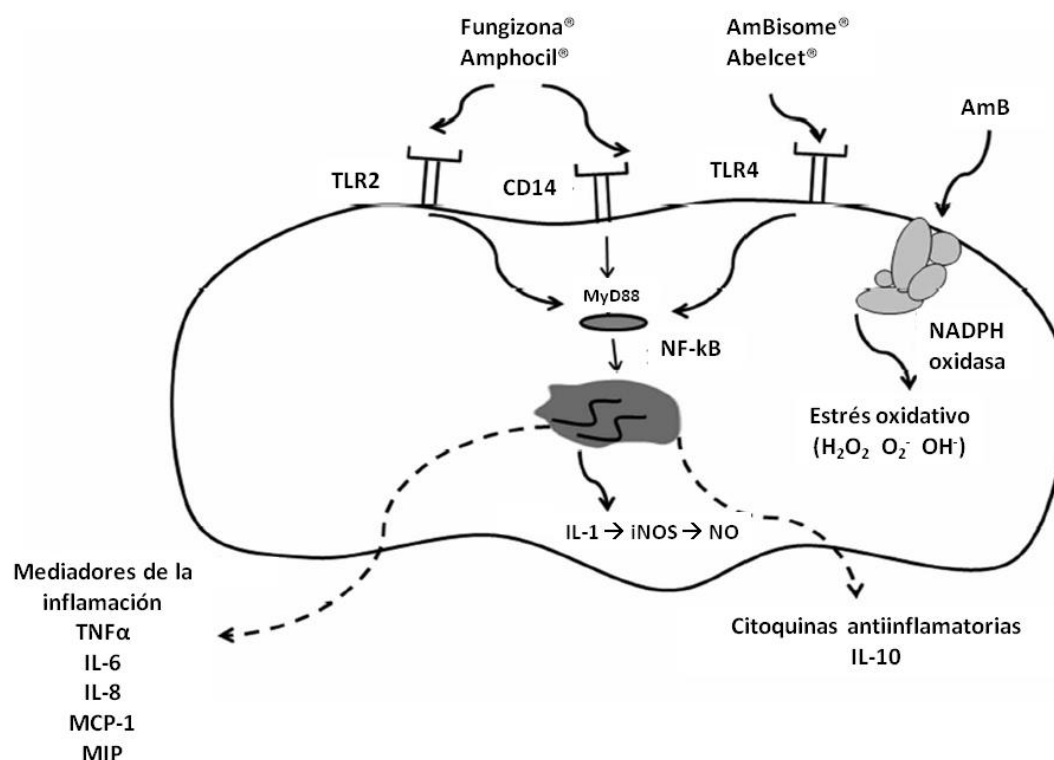


Figura 13. Efecto inmunomodulador de la AmB [adaptado de [88]].

La unión de la AmB con los TLR desencadena la polimerización de los receptores que activan una vía de señalización que involucra el reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88, la cual en última instancia activa al NF-kB, factor que se transloca al núcleo induciendo la expresión de genes involucrados en la activación de los macrófagos [114]. Puede inducir la producción de citoquinas proinflamatorias (tales como interleucinas 6 y 8 – IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral alfa – TNFα, proteína quimiotáctica de monocitos 1 – MCP-1, proteínas inflamatorias de macrófagos, MIP) o antiinflamatorias (interleucina 10 – IL-10) según el receptor al que se una la AmB inicialmente. Además la AmB es capaz de interactuar con los receptores CD14 activando a su vez la vía de señalización de los TLR [115].

En células endoteliales, la AmB es capaz de inducir la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (por medio de la IL-1), incrementando la producción de óxido nítrico (NO), que juega un papel importante en la vasodilatación y en la protección frente a diversos patógenos [116]. Por otro lado, la unión de la AmB con los esteroides de la

membrana podría inducir cambios conformacionales que activan ciertas enzimas de membrana implicadas en el estrés oxidativo como la NADPH oxidasa, dando lugar a la acumulación de radicales libres tales como especies reactivas de oxígeno con capacidad antimicrobiana [117].

Sin embargo, hay que tener en cuenta que en algunas ocasiones también se ha descrito un efecto inmunosupresor por parte de la AmB [118] y que alteraciones en la respuesta inmunitaria pueden originar profundos cambios en el hospedador dando lugar a efectos secundarios importantes tales como: toxicidad derivada del incremento de citoquinas proinflamatorias o por ejemplo, toxicidad a nivel renal al inducirse la apoptosis y alterarse la expresión de la óxido nítrico sintasa constitutiva [119, 120].

El tipo de respuesta Th que sea activada por el hospedador es clave en la evolución de las infecciones fúngicas y parasitarias. En general, la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , Il-1, Il-6, etc) activan una respuesta Th1, caracterizada por la activación de macrófagos y la producción de NO y superóxido, lo cual se asocia con una protección del hospedador frente a la infección. Por el contrario, la respuesta Th2 (Il10, Il-4, Il-2, etc) se asocia con una mayor susceptibilidad a la infección y con mayor capacidad del microorganismo de evadir la respuesta inmunitaria del hospedador [88, 121].

Diversos estudios han mostrado que dependiendo del tipo de formulación, la AmB tiene más afinidad por interactuar con un tipo de TLR u otro. Parece ser que, tanto la Fungizona<sup>®</sup> como el Amphocil<sup>®</sup> presentan una mayor afinidad por el TLR2 en presencia de monocitos humanos, ya que son capaces de inducir la expresión de citoquinas proinflamatorias tales como: Il-1, TNF-  $\alpha$ , proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) o proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP), mientras que este efecto no se observa en presencia de AmBisome<sup>®</sup> o Abelcet<sup>®</sup> [122]. Por el contrario, el AmBisome<sup>®</sup> en presencia de polimorfonucleares parece tener una mayor afinidad por los TLR4 induciendo una respuesta antiinflamatoria al incrementar los niveles de IL-10 [113]; aunque en presencia de polimorfonucleares con una relativa ausencia de los TLR4, el AmBisome<sup>®</sup> interactúa con los TLR2 comportándose de manera similar a la Fungizona<sup>®</sup> siendo capaz igualmente de activar una respuesta Th1 [113]. De esta manera, una menor producción de citoquinas proinflamatorias podría explicar porque

los efectos adversos relacionados con la administración intravenosa de Fungizona® se ven atenuados cuando se administra el AmBisome®.

#### 1.1.4.2. Espectro de acción

La AmB se utiliza para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas y sistémicas. Según la sensibilidad del hongo y la concentración del fármaco en el lugar de la infección, la AmB puede comportarse como fungicida o como fungistático [123].

**Tabla 4. Espectro de acción de la AmB en comparación con otros antifúngicos con actividad sistémica (adaptado de: [124]).**

Microorganismo	AmB	Flucitosina	Ketoconazol	Itraconazol	Fluconazol	Voriconazol	Caspofungina
Género <i>Candida</i>	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++
- <i>C. albicans</i>	+++	++++	++	++	++	+++	++++
- <i>C. glabrata</i>	++++	++++	+++	++++	++++	++++	+++
- <i>C. parapsilosis</i>	+++	++++	+++	+++	++++	++++	++++
- <i>C. tropicalis</i>	++	+	+	++	0	++++	++++
- <i>C. krusei</i>							
<i>Cryptococcus neoformans</i>	++++	+++	+	++	+++	++++	0
Género <i>Aspergillus</i>	++++	0	0	++++	0	++++	+++
Género <i>Fusarium</i>	+++	0	0	+	0	+++	0
Cigomicetos	++++	0	0	0	0	0	+
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	++++	0	++	++++	+	++++	++
<i>Coccidioides immitis</i>	++++	0	++	++++	++++	++++	++
<i>Histoplasma capsulatum</i>	++++	0	++	++++	++	++++	++
<i>Penicillium marneffei</i>	++++	0	++	++++	++	++++	
<i>Sporothrix schenckii</i>	++++	0	++	++++	++		
Hongos miceliales dermatiáceos	+++	+	++	+++	+	+++	0
<b>Clave: la actividad antifúngica se clasifica en: inactivo o no recomendado (0), actividad ocasional (+), actividad moderada con descripciones de resistencia (++) , actividad fiable con resistencia ocasional (+++), muy activo, resistencia infrecuente o no descrita (++++).</b>							

Su espectro de acción es muy amplio y está caracterizado por presentar un alto grado de actividad frente a la mayor parte de agentes causantes de micosis sistémicas, siendo los más frecuentes: *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.* y *Aspergillus spp.*; pero también la AmB es activa frente a muchos otros hongos patógenos tales como: *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Scedosporium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Sporothrix schenckii*, *Fusarium spp.*, *Penicilium spp.*, *Rhodotorula spp.*, cigomicetos y otros hongos miceliales dermatiáceos [125, 126] (Tabla 4).

La mayoría de las cepas son inhibidas a una concentración de AmB de entre 0.03 y 1.0 µg/mL *in vitro* [123]. La principal ventaja de la AmB respecto a otros antifúngicos de uso sistémico es su mayor actividad antifúngica frente a cigomicetos y microorganismos del género *Aspergillus* y *Fusarium* [127].

La AmB no es activa frente a bacterias, rickettsias ni virus [123]. Sin embargo, presenta actividad frente a algunos protozoos tales como *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Plasmodium* [2, 110, 128-130]. En la práctica clínica, la AmB es un fármaco ampliamente utilizado para el tratamiento de la leishmaniasis visceral y cutánea. En comparación con otros fármacos utilizados en clínica (tales como la miltefosina, la paramomicina o el estibogluconato de sodio), por lo general, la AmB presenta una actividad leishmanicida superior, sin embargo, su toxicidad es el principal factor que limita su uso (Tabla 5). Además, cabe destacar, que existen diferencias significativas a nivel de actividad según el tipo de formulación de AmB que se utilice, que puede atribuirse en cierta medida al diferente perfil farmacocinético que presentan las distintas formulaciones, cuyo tema será tratado en la sección 1.5.

**Tabla 5. Comparación de la actividad anti-leishmania de diferentes fármacos usados en la práctica clínica y actividad antileishmania de diferentes formulaciones de AmB *in vitro* e *in vivo*.**

Especie/forma parasitaria (experimento <i>in vivo</i> o <i>in vitro</i> )	Fungizona®	Miltefosina	Paramomicina	Estibogluconato de sodio	AmBisome®	Abelcet®	Amphocil®	Ref.
<i>L. donovani</i> / amastigotes ( <i>in vitro</i> )	0.06	3.1	46.4	29.8	-	-	-	[131]
<i>L. donovani</i> / amastigotes ( <i>in vitro</i> )	0.013	-	-	-	1.5	2.6	0.02	[132]
<i>L. major</i> / amastigotes ( <i>in vitro</i> )	0.2	-	-	-	1.8	2.9	0.6	[132, 133]
<i>L. donovani</i> / (modelo <i>in vivo</i> de leishmaniasis visceral)	0.21	-	-	-	0.73	2.7	0.32	[132]
La actividad de los estudios <i>in vitro</i> viene expresada como la concentración (µg/mL) necesaria para inhibir el 50% del crecimiento parasitario y en los estudios <i>in vivo</i> se expresa como la dosis (mg/kg) necesaria para reducir el 50% de la carga parasitaria en el hígado de ratones BALB/c.								

#### 1.1.4.3. Resistencias

A pesar del extendido uso de la AmB, la aparición de resistencias es bastante rara. Se han descrito resistencias con algunas cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* y *C. tropicalis* [126]. También se han descrito algunas otras cepas resistentes a la AmB



como *S. apiospermum*, *S. prolificans*, *S. schenckii* y *Fusarium spp.*, aunque no son especialmente relevantes en la práctica clínica [126].

Se podría considerar que la aparición de resistencias tiene lugar por tres tipos de vías diferentes [88]:

1. Disminución del contenido de ergosterol en la membrana celular [134, 135].  
La aparición de resistencias está relacionado con una alteración en la síntesis del ergosterol y también con cambios en la pared celular [136]. Hay que tener en cuenta que pueden darse resistencias cruzadas entre los azoles y la AmB debido a que los azoles inhiben la síntesis de ergosterol [137].
2. Tolerancia al estrés oxidativo.  
La exposición a concentraciones subinhibitorias de fluconazol puede inducir en las levaduras una respuesta que les hace ser más resistentes al estrés oxidativo (causado por ROS) y al estrés nitrosativo (causado por NO) generando un mayor tolerancia al estrés oxidativo causado por la AmB [138, 139]. Por un mecanismo similar, se han descrito cepas de *C.albicans* resistentes a la AmB, caracterizadas por presentar una menor susceptibilidad en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debido a un incremento en la actividad de la catalasa [140].
3. Alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial.  
Aunque no exista una correlación perfectamente establecida, cabe pensar que la cadena respiratoria mitocondrial podría jugar un papel clave en el desarrollo de resistencias frente a la AmB, no solamente por estar implicada en la acumulación de radicales libres dentro de la célula, sino también por el hecho de ser requerida para la síntesis de ergosterol [141].

#### **1.1.5. Medicamentos comercializados y propiedades farmacocinéticas**

En el momento actual, la administración IV de AmB sigue siendo la ruta de administración preferente para el tratamiento de infecciones sistémicas, aunque en ocasiones, la vía tópica también resulta de gran utilidad para tratar infecciones cutáneas de manera local evitando así los efectos adversos asociados a la administración IV del fármaco.

A grandes rasgos, se pueden destacar ciertos aspectos que caracterizan el perfil farmacocinético de la administración IV de AmB:

1. Alta unión (95 - 99%) a proteínas plasmáticas tales como albúmina,  $\beta$ -lipoproteínas y  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida [142].
2. Acumulación en tejidos. En general, tras la administración IV se encuentran altas concentraciones de fármaco en hígado, bazo y pulmón, aunque existen importantes diferencias entre unas formulaciones y otras [13].
3. La AmB sigue un patrón bifásico de eliminación plasmática, caracterizado por una semivida inicial de 24- 48 h y una fase de eliminación más lenta (aproximadamente durante 15 días) [143, 144].
4. La mayor parte del fármaco es eliminado de forma inalterada, de hecho parece ser que el metabolismo no juega un papel clave en la eliminación del mismo [143]. Berkersky et al., han descrito que una semana después de la administración IV de AmB, cerca del 40% del fármaco ha sido excretado a través de la bilis siendo eliminado por vía fecal y en torno a un 20% por vía urinaria [145].

En la tabla 6, se recogen las principales diferencias farmacocinéticas entre la AmB convencional y las nuevas formulaciones de AmB comercializadas. Las nuevas formulaciones lipídicas presentan un perfil farmacocinético diferente al de la AmB convencional (Fungizona<sup>®</sup>, dispersión micelar de AmB y desoxicolato de sodio).

Dentro de las formulaciones lipídicas existen dos grupos con características diferentes. Por un lado, nos encontramos con el Abelcet<sup>®</sup>, Amphocil<sup>®</sup> y Fungisome<sup>™</sup>, caracterizados por presentar una rápida desaparición de sangre tras la administración IV, lo cual se relaciona con una rápida distribución en tejidos (posiblemente tras ser fagocitados por los macrófagos del SRE una vez que han sido opsonizados por los componentes del plasma). Esto explicaría los bajos valores de AUC y de C<sub>max</sub> plasmática así como los altos valores de semivida plasmática de eliminación y volumen de distribución. Por otro lado, el AmBisome<sup>®</sup> presenta unas características diferentes a todos los demás. Tras la administración IV, el fármaco permanece en plasma, que en este caso actuaría como reservorio para después ser distribuido a los diferentes tejidos [13]. Este peculiar comportamiento viene marcado por altos valores de AUC y C<sub>max</sub> plasmáticos y un menor volumen de distribución y semivida de eliminación. Este perfil

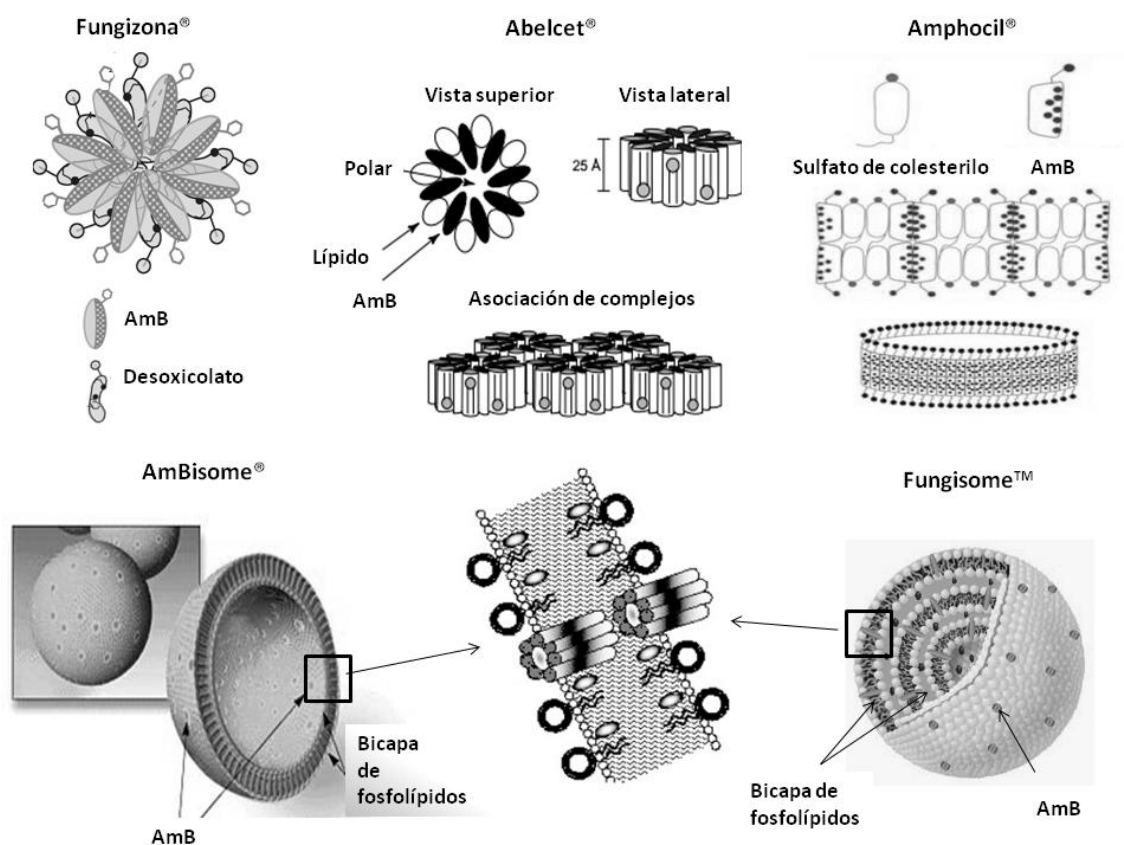
farmacocinético podría explicarse por el hecho de que el AmBisome® al estar constituido por pequeños liposomas unilamelares (constituidos por fosfatidilcolina de soja, colesterol, diestearoil fosfatidil glicerol y alfa-tocoferol) pasan desapercibidos más fácilmente frente al SRE [13].

**Tabla 6. Características farmacocinéticas de las principales formulaciones comercializadas de AmB.**

Formulación	Tamaño (µm)	Estructura	Dosis (mg/kg)	Cmax (µg/mL)	AUC (µg * h/mL)	Vd (L/kg)	t <sub>1/2</sub> (h)	Ref.
<b>Fungizona®</b>	0.035	Micelas	0.6	1.1	17.1	5.1	-	[146]
			1	1.7	18.7	2.4	26.8	[147]
			0.8	1.46	17.2	-	-	[148]
<b>Abelcet®</b>	1.6 - 11	En forma de cinta	5	1.7	9.5	131	173.4	[146, 149]
			5	2.39	19.17	132.8	393	[150]
			2.5	1.09	8.9	-	-	[151]
<b>Amphocil®</b>	0.11 – 0.14	En forma de disco	5	3.1	43	4.3	-	[146]
			0.25	0.8	9.4	3.4	86	[152]
			0.5	0.84	21.0	5.5	157	[152]
			1	2.2	46.3	7.6	244	[152]
			1.5	2.5	57.3	8.9	235	[152]
<b>AmBisome®</b>	0.06 - 0.08	Liposomas unilaminares	5	83	555	0.11	-	[146]
			1	8	27	0.58	10.7	[153]
			2.5	19	65	0.69	8.1	[153]
			5	58	269	0.22	6.4	[153]
			7.5	90	476	0.26	8.5	[153]
<b>Fungisome™</b>	2.7 – 3.5	Liposomas multilaminares	1	1.012	11.43	2.28	17.2	[154]
Los datos recogidos en la tabla hacen referencia a estudios de farmacocinética en humanos. En el caso de los valores de Cmax y AUC se refieren a los valores obtenidos tras la primera dosis de tratamiento. AUC, Área bajo la curva; Cmax, concentración plasmática máxima; Vd, volumen de distribución, t <sub>1/2</sub> , semivida de eliminación terminal.								

Además, el AmBisome® presenta una excepcional estabilidad en plasma, lo que se atribuye a la disposición que tienen las moléculas de AmB dentro del liposoma, las cuales se encuentran formando un poro en la bicapa de fosfolípidos, que a su vez permite el flujo de iones a través de la membrana lipídica y evita que la AmB se disocie del liposoma una vez que entra en contacto con el torrente sanguíneo (Figura 14) [154]. De esta manera, los liposomas presentan una prolongada permanencia en plasma pero a la vez buena penetración en tejidos [155]. A altas dosis, no existe una farmacocinética lineal, que parece estar relacionado con la saturación del SRE [153]. La diferente actividad del SRE es una de las razones que explicaría la gran variabilidad interindividual.

A pesar de que el Fungisome™ es también una formulación liposomal, se trata de liposomas multilamelares de gran tamaño (los cuales tienen que ser sonicados antes de ser utilizados). Su perfil farmacocinético es completamente diferente al del AmBisome®. En parte esta diferencia podría relacionarse con el diferente tamaño de partícula de ambas formulaciones. El AmBisome® presenta un tamaño de entre 60 – 80 nm, mientras que el Fungisome™ es un liposoma multilamellar con un tamaño que oscila entre los 2.7 – 3.5 µm siendo fácilmente reconocido por el SRE. De manera similar le ocurre al Abelcet® (complejo lipídico formado por L-α-dimiristoilfosfatidilcolina y L-α-dimiristoilfosfatidilglicerol) debido a su estructura en forma de cinta y con un tamaño de partícula micrométrico (Figura 14).



**Figura 14. Representación de la estructura de las diferentes formulaciones de AmB [adaptado de: [154, 156-158].**

Cada formulación presenta una distribución en tejidos característica. Así por ejemplo, cabe destacar que el Abelcet® presenta altos valores en hígado al igual que el Amphocil® (dispersión coloidal entre AmB y sulfato sódico de colesterol), pero además es el fármaco con mayor acumulación en pulmón y bazo (teniendo especial interés en el tratamiento de infecciones fúngicas pulmonares). El AmBisome® presenta una menor

concentración de AmB en hígado que es similar a los valores de concentración obtenidos tras la administración de Fungizona®. Sin embargo, el AmBisome® alcanza concentraciones de AmB bastante elevadas en bazo y en cerebro en comparación a la Fungizona®, lo que le hace especialmente útil en el tratamiento de leishmaniasis visceral o infecciones del sistema nervioso central. Además cabe destacar que todas las nuevas formulaciones lipídicas presentan concentraciones más bajas que la Fungizona® a nivel renal, lo que podría explicar la menor nefrotoxicidad de las mismas [13, 159].

### **Medicamentos genéricos**

Hasta ahora, las formulaciones lipídicas son más utilizadas en clínica que la Fungizona® debido a su mejor perfil de seguridad entre otros factores. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la fecha de expiración de las patentes está próxima a su fin (año 2014 para el Abelcet® y 2016 para el AmBisome® [160]), por lo que nuevos medicamentos genéricos aparecerán en el mercado en los próximos años.

Esto trae consigo ciertas inquietudes relativas a la eficacia y toxicidad de estos nuevos medicamentos genéricos. Dos puntos claves a tener en cuenta serían:

1. El tipo de formulación, lo cual aunque pudiera parecer relativamente sencillo, se trata de formulaciones con un perfil farmacocinético muy diferente unas de otras y que en última instancia condiciona tanto la eficacia como la seguridad de la formulación. Como ejemplo, se puede hacer mención a las diferencias existentes entre las dos formulaciones liposomales que existen actualmente en el mercado: AmBisome®, comercializado a nivel mundial y Fungisome™, comercializado en la India (con un coste total del tratamiento muy inferior al del AmBisome® [161]) donde la prevalencia de leishmaniasis visceral puede llegar al 60% en ciertas regiones del país [162].
2. La pureza del principio activo; la AmB genérica como materia prima no es 100% pura, sino que contiene un determinado porcentaje de otros polienos que pueden tener cierta influencia en el efecto final del medicamento. Cleary et al., estudiaron el efecto de AmB de alta pureza (> 95%) en un modelo *in vivo* de candidiasis sistémica, resultando ser más activa y con mejor perfil de seguridad que la AmB genérica [163].

Esto pone de manifiesto que la elaboración de medicamentos genéricos de AmB no es tan sencilla como parece y por lo tanto, rigurosos estudios de bioequivalencia deben ser llevados a cabo para poder evaluar tanto la eficacia como la toxicidad de los nuevos genéricos que entren en el mercado.

#### **1.1.6. Toxicidad y eficacia**

##### **1.1.6.1. Efectos adversos**

Los principales efectos adversos relacionados con la administración IV de AmB son: la nefrotoxicidad y las reacciones adversas relacionadas con la perfusión. De hecho, la aparición de efectos adversos es uno de los principales problemas que limita la terapia de infecciones fúngicas y parasitarias con Fungizona<sup>®</sup>. Con las nuevas formulaciones lipídicas se ha conseguido reducir parte de la toxicidad asociada a la administración IV de la AmB convencional; aún así los efectos adversos de la AmB son muy numerosos. Estos efectos se esquematizan en la tabla 7, destacándose los que se presentan de forma muy común tras su administración IV.

La toxicidad aguda que aparece durante o tras la administración IV del fármaco se relaciona con la producción de citoquinas proinflamatorias. Entre los efectos adversos agudos más comunes se puede destacar: fiebre, escalofríos y rigidez, cefaleas, náuseas, vómitos, diarrea, dolor en el lugar de la inyección con o sin flebitis, etc. Algunos de estos efectos adversos, se pueden mitigar con la administración de analgésicos, heparina, antihistamínicos y/o antieméticos.

La principal toxicidad crónica se manifiesta a nivel renal. Entre los factores de riesgo para desarrollar nefrotoxicidad se encuentran: pertenecer al género masculino, una dosis diaria superior o igual a 35 mg/día, utilización concomitante de diuréticos u otros fármacos nefrotóxicos, peso corporal superior o igual a 90 kg y una función renal basal anormal [164]. El daño renal se manifiesta como insuficiencia renal, hipocalemia, hipomagnesemia, acidosis metabólica y poliuria secundaria a diabetes insípida [164]. Generalmente, la función renal mejora con la interrupción de la terapia. Sin embargo, pueden aparecer frecuentemente algunos trastornos permanentes, especialmente cuando se administra una dosis acumulada superior a 5 g [123]. Estudios en humanos han demostrado que la administración de solución salina, ya sea por vía oral o parenteral, reduce considerablemente la incidencia y severidad del daño renal secundario a AmB

[164]. Otro efecto adverso a tener en cuenta y que aparece hasta en un 70% de los pacientes es la anemia [164].

**Tabla 7. Efectos adversos ocasionados por la administración IV de Fugizona®**

SISTEMA AFECTADO	FRECUENCIA	REACCIÓN ADVERSA
<b>Generales</b>	Muy comunes	Fiebre (a veces acompañada de escalofríos), malestar, pérdida de peso.
	Infrecuentes	Sofocos.
<b>Sistema digestivo</b>	Muy comunes	Anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, dispepsia, dolor epigástrico (calambres).
	Comunes	Gastroenteritis hemorrágica, melena.
	Infrecuentes	Anomalías en las pruebas de función hepática, ictericia, fallo hepático agudo.
<b>Sistema respiratorio</b>	Infrecuentes	Disnea, broncoespasmo, edema pulmonar no cardiogénico, neumonitis por hipersensibilidad.
<b>Sistema nervioso</b>	Muy común	Cefalea
	Comunes	Convulsiones, pérdida de audición, tinnitus, vértigo transitorio, visión borrosa o diplopía, neuropatía periférica, encefalopatía.
<b>Sistema dermatológico, reacciones alérgicas y locales</b>	Muy comunes	Dolor en el lugar de inyección con o sin flebitis o tromboflebitis.
	Comunes	Reacciones anafilactoides y otras reacciones alérgicas: rash, prurito.
<b>Sistema cardiovascular</b>	Infrecuentes	Parada cardíaca, arritmias (incluyendo fibrilación ventricular), insuficiencia cardíaca, hipertensión, hipotensión, shock.
<b>Sistema musculoesquelético</b>	Muy comunes	Dolor generalizado, incluyendo mialgias y artralgias
<b>Sistema sanguíneo y linfático</b>	Muy comunes	Anemia normocítica normocrómica.
	Comunes	Agranulocitosis, alteraciones de la coagulación, trombocitopenia, leucopenia, eosinofilia, leucocitosis.
<b>Sistema renal</b>	Muy comunes	Deterioro y anomalías de la función renal, incluyendo: azotemia, elevación de la creatinina sérica, hipocalcemia, hipostenuria, acidosis tubular renal y nefrocalcinosis.
	Comunes	Hipomagnesemia, hipercalcemia, fracaso renal agudo, anuria, oliguria.
<b>La frecuencia de las reacciones adversas se clasifica en: muy comunes (&gt; 1/10), comunes (&gt;1/100, &lt; 1/10), infrecuentes (&gt;1/1000, &lt;1/100), raros (&gt;1/10000, &lt; 1/1000) y muy raros (&lt;1/10000) [123].</b>		

#### 1.1.6.2. Toxicidad, eficacia y coste

A la hora de decidir qué formulación es más adecuada, es necesario tener en cuenta una serie de factores tales como toxicidad, eficacia y coste. En la tabla 8, se compara la toxicidad y eficacia frente a diferentes patógenos de las diferentes formulaciones comercializadas de AmB. Cabe destacar la menor toxicidad renal de las formulaciones

lipídicas respecto a la AmB convencional. En cuanto a la toxicidad aguda relacionada con la administración IV, el AmBisome® es el que presenta un mejor perfil de seguridad en comparación con el resto de formulaciones. No obstante, no parece que exista una mejora substancial de la eficacia de las formulaciones lipídicas frente a la Fungizona® [165].

**Tabla 8. Toxicidad y eficacia comparada entre las diferentes formulaciones comercializadas de AmB.**

Formulaciones	Patógeno	Eficacia	Toxicidad		Ref.
			Renal	Relacionada con la administración	
<b>D-AmB vs L-AmB</b>	<i>Cryptococcus spp.</i>	Igual	Menor L-AmB	Menor L-AmB	[166]
<b>D-AmB vs L-AmB</b>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Mayor L-AmB	Menor L-AmB	Menor L-AmB	[167]
<b>D-AmB vs L-AmB</b>	Tratamiento empírico. Pacientes con neutropenia febril	Igual	Menor L-AmB	Menor L-AmB	[168]
<b>D-AmB vs ABLC</b>	<i>Candida spp.</i>	Igual	Menor ABLC	Igual	[169]
<b>D-AmB vs ABCD</b>	<i>Aspergillus spp.</i>	Igual	Menor ABCD	Menor D-AmB	[170]
<b>D-AmB vs ABCD</b>	Tratamiento empírico. Pacientes con neutropenia febril	Igual	Menor ABCD	Mayor ABCD	[171]
<b>D-AmB vs MLV-AmB</b>	Tratamiento empírico. Pacientes con neutropenia febril	Igual	Menor MVL-AmB	Menor MVL-AmB	[172]
<b>ABLC vs L-AmB</b>	Pacientes con leucemia y Infección fúngica	Igual	Menor L-AmB	Mayor ABLC	[173]
<b>ABLC vs L-AmB</b>	Tratamiento empírico. Pacientes con neutropenia febril	Igual	Mayor ABLC	Mayor ABLC	[174]
<b>D-AmB vs L-AmB</b>	Leishmaniasis visceral	Igual	Menor L-AmB	Menor L-AmB	[175]
<b>D-AmB vs ABLC</b>	Leishmaniasis visceral	Igual	Menor ABLC	Menor ABLC	[175]
Clave: ABCD (Amphocil®); ABLC (Abelcet®); L-AmB (AmBisome®); D-AmB (Fungizona®); MLV-AmB (Fungisome™)					

Un detalle a tener en cuenta es que las formulaciones lipídicas al presentar una menor toxicidad, pueden ser administradas en dosis superiores (5 mg/kg en vez de 1 mg/kg) que la Fungizona®, lo que en última instancia puede traducirse en mayor eficacia.

No obstante, hay que considerar que el coste del tratamiento de las formulaciones lipídicas (a excepción del Amphocil®) es muy superior al de la Fungizona® (Tabla 9). Sin embargo, sería más correcto tener en cuenta el gasto global por paciente incluyendo



los costes derivados de la hospitalización y el tratamiento de los efectos adversos. En ese sentido, el perfil farmacoeconómico del AmBisome® parece ser más favorable cuando se compara al de la Fungizona®, resultando un coste global en torno a 3000 € menos cuando el paciente es tratado con la especialidad liposómica [176].

**Tabla 9. Comparación del coste diario del tratamiento con diferentes formulaciones de AmB para un paciente de 70 kg.**

Tratamiento	Dosis recomendada (mg/kg)	Precio/contenido del vial	Coste diario del tratamiento para un paciente de 70 kg
Fungizona®	0.6 – 1	5.8 €/ 50 mg	5.8 – 11.2 €
AmBisome®	1 - 3	141 € / 50 mg	282 – 705 €
Abelcet®	3 - 5	65.3 € / 50 mg	326.5 – 457.1 €
Amphocil®	3 - 4	3.12 € / 50 mg	15.6 – 18.7 €
Fungisome™	1 - 3	85 € / 50 mg	170 – 425 €

### 1.1.7. Indicaciones terapéuticas y posología

#### 1.1.7.1. Indicaciones terapéuticas

Las formulaciones lipídicas de AmB se emplean en micosis sistémicas graves en las que la AmB convencional no puede usarse por toxicidad, especialmente toxicidad renal, o cuando no han respondido al tratamiento con AmB convencional u otros antimicóticos.

La AmB liposomal (AmBisome®) y el complejo lipídico (Abelcet®) se emplean también en leishmaniasis visceral. La AmB en complejo con sulfato sódico de colesterilo (Amphocil®) se reserva para aspergilosis invasiva en pacientes con insuficiencia renal o toxicidad inaceptable que impide el uso de AmB a dosis efectivas y en casos resistentes a terapia antifúngica previa [177].

En la tabla 10, se recoge el tratamiento utilizado en España frente a diferentes tipos de infecciones fúngicas y leishmaniasis.

**Tabla 10. Tratamiento más frecuente de infecciones fúngicas y leishmaniasis en España [177].**

Tipo de infección	Tratamiento de elección	Tratamiento alternativo
<b>Candidiasis</b>		
Cutánea, vaginal, oral, esofágica leve	Nistatina	Clotrimazol o miconazol
Esofágica moderada	Fluconazol	Ketoconazol
Esofagitis grave	Fluconazol IV o voriconazol IV	AmB o caspofungina
Candiduria	Fluconazol	AmB (irrigaciones vesicales)
Peritonitis	AmB IP	Fluconazol (VO/ IP) + flucitosina VO
Funguemia	AmB formulaciones lipídicas (± flucitosina) o caspofungina	Fluconazol
<b>Aspergilosis</b>		
Aspergiloma pulmonar	Eficacia dudosa del tratamiento farmacológico (itraconazol)	
Broncopulmonar alérgica	Corticoesteroides sistémicos (3 – 6 meses)	
Invasiva /Pulmonar necrotizante crónica	AmB o voriconazol IV	Caspofungina
<b>Otras infecciones</b>		
<b>Criptococosis</b>	AmB seguido de fluconazol	AmB + flucitosina
<b>Mucormicosis (zigomicosis)</b>	AmB	
<b>Histoplasmosis</b>	AmB	Itraconazol
<b>Neumocistosis</b>	Cotrimazol	Pentamidina IV
<b>Leishmaniasis visceral</b>	Antimoniales (Glucantime®) o AmB liposomal	

### 1.1.7.2. Posología

#### **AmB convencional (Fungizona®) [123]**

- Candidiasis: 0.4 – 0.6 mg/kg/día.
- Criptococosis: 0.3 mg/kg/día.
- Coccidiomicosis: 1 – 1.5 mg/kg/día.
- Blastomicosis: 0.3 – 1 mg/kg/día.
- Histoplasmosis: 0.5 – 1 m/kg/día.
- Aspergilosis: 0.5 – 1 mg/kg/día o superiores en caso de infecciones graves.
- Mucormicosis rinocerebral: 0.7 - 1.5 mg/kg/día.

La duración del tratamiento para micosis profundas puede ser de 6 a 12 semanas o más.

#### **AmB liposomal (AmBisome®) [177]**

- Tratamiento específico de micosis sistémicas: 1 – 3 mg/kg/día (en casos graves, hasta 5 mg/kg/día).
- Tratamiento empírico en pacientes neutropénicos: 1- 3 mg/kg/día.
- Leishmaniasis visceral en inmunocompetentes e inmunodeprimidos que no hayan respondido a antimoniales ni a AmB convencional: 1 -1.5 mg/kg/día x 21 días (pauta preferible en inmunocomprometidos) ó 3 mg/kg/día x 10 días.

#### **AmB complejo lipídico (Abelcet®) [177]**

- Tratamiento empírico o de micosis sistémicas: 5 mg/kg/día si se tolera.
- Tratamiento de leishmaniasis visceral: 3 mg/kg/día durante 5 días consecutivos o durante 9 días alternos (dosis total 15 – 30 mg/kg).
- Profilaxis secundaria de la leishmaniasis visceral en pacientes con infección por VIH con recuento de linfocitos T CD4+ < 200 cel/μL: 3 mg/kg cada 21 días.

#### **AmB complejo sulfato sódico de colesteroil (Amphocil®) [177]**

- Dosis recomendada: 3 – 4 mg/kg/día o si el paciente lo precisa hasta 6 mg/kg/día.

### **1.1.8. Nuevas formulaciones de anfotericina B**

#### **1.1.8.1. Administración por vía IV**

Hasta la fecha, la administración IV de AmB sigue siendo la ruta de administración preferente. En España, las formulaciones lipídicas son más utilizadas en la práctica clínica que la AmB convencional, ya que presentan menor toxicidad. Sin embargo, debido a su alto coste, sería interesante desarrollar nuevas formulaciones con una eficacia igual o superior a las formulaciones existentes pero que tengan una baja toxicidad (con menos problemas asociados a la infusión y menor toxicidad renal y hemolítica) y que al mismo tiempo sean coste-efectivas (lo que implica materias primas de bajo coste y proceso de producción relativamente sencillo) para poder expandir la terapia antifúngica y antiprotozoaria con AmB. Por otro lado, sería útil desarrollar sistemas de liberación controlada que mantuviesen una concentración suficiente de AmB en el lugar de la infección, pudiendo espaciar el tiempo de administración entre

una dosis y otra, lo que en cierta medida evitaría periodos de hospitalización tan prolongados.

**Tabla 11. Nuevas formulaciones de AmB de administración parenteral**

Formulación	Composición	Toxicidad	Eficacia	Ref.
<b>Microemulsión</b>	Polisorbato 80, miristato de isopropilo, lecitina	Menor toxicidad renal que Fungizona®	<i>In vivo</i> : mayor eficacia que Fungizona® frente a <i>C. albicans</i>	[178]
	Brij 96, miristato de isopropilo, lecitina	Mayor DL <sub>50</sub> que Fungizona®	-	[179]
	Pecol, Mys40, Solutol HS15	Menor toxicidad hemolítica y mayor DL <sub>50</sub> que Fungizona®	<i>In vitro</i> : Igual que Fungizona® frente a <i>C. albicans</i>	[180]
<b>Microesferas</b>	Albúmina con PEG	Menor toxicidad hemolítica que Fungizona®	<i>In vitro</i> : Igual que Fungizona® frente a <i>C. albicans</i>	[181]
<b>Nanopartículas</b>	PLGA y ácido mercaptosuccínico	Menor toxicidad hepática y renal que Fungizona®	<i>In vivo</i> : Igual que Fungizona® frente a paracoccidiomicosis	[182]
	PLGA	Menor toxicidad hemolítica que AmB libre pero mayor que el AmBisome®	<i>In vitro</i> : mayor que Fungizona® e igual que AmBisome® frente a <i>A. fumigatus</i>	[183]
	Polibutirilcanoacrilato y polisorbato 80	Menor toxicidad hemolítica y renal que el AmBisome®	<i>In vivo</i> : mayor que AmBisome® frente a meningitis por <i>Cryptococcus</i>	[184]
<b>Nanocápsulas</b>	Chitosán	Menor toxicidad hemolítica y en macrófagos que la Fungizona® y el AmBisome®	Buena actividad <i>in vivo</i> frente a <i>L. donovani</i>	[185]
<b>Nanoesferas</b>	PLGA, monoestearato de sorbitano y polisorbato 80	Menor toxicidad hemolítica que AmB libre	<i>In vitro</i> : mejor que AmB libre frente a <i>C. albicans</i>	[186]
	Poli(ε-caprolactona) con poloxamer	Menor toxicidad hemolítica y mayor DL <sub>50</sub> que Fungizona®	<i>In vivo</i> : menor que Fungizona® frente a <i>C. albicans</i>	[187]
<b>Nanosuspensión</b>	PVA	Menor toxicidad hemolítica que AmB libre pero mayor que AmBisome®	<i>In vitro</i> : mayor que Fungizona® y AmBisome® frente a <i>A. fumigatus</i>	[183]
<b>Micelas mixtas</b>	Poloxamer	Menor toxicidad hemolítica y mayor DL <sub>50</sub> que Fungizona®	<i>In vivo</i> : menor que Fungizona® frente a <i>C. albicans</i>	[187]
<b>Micelas poliméricas</b>	Angiopep-2 conjugado a PEG-PE	Menor toxicidad hemolítica y citotoxicidad en células endoteliales del cerebro que Fungizona®	<i>In vivo</i> : mayor que Amphocil® frente a meningitis por <i>Cryptococcus</i>	[188, 189]
	Polioxietileno copolímero de bloque conjugado a poli-aspartico	Menor toxicidad hemolítica que AmB libre	<i>In vivo</i> : igual que Fungizona® frente a <i>C. albicans</i>	[190]
<b>Gel de formación in situ</b>	Carboximetilcelulosa y dextrano	Sin toxicidad en el lugar de la administración (peritoneo)	11 días de liberación sostenida y 3 semanas de actividad <i>in vivo</i> frente a <i>C. albicans</i>	[191]

Clave: DL<sub>50</sub>, dosis que produce la muerte del 50% de los animales; Brij, éter polioxetilado de ácidos grasos; Pecol, monooleato de glicerol; Mys40, estearato de polietilenglicol 40; Solutol HS 15, 15-hidroxiestearato de polietilenglicol; PEG, polietilenglicol; PLGA, copolímero del ácido láctico y glicólico; Angiopep-2, péptido con alta capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica; PEG-PE, 1,2-Distearoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000; PVA, alcohol polivinílico;

Existe un gran número de nuevas formulaciones de AmB en investigación en fase preclínica que han demostrado tener una eficacia igual o superior a las formulaciones comercializadas pero con menor toxicidad renal y hemolítica (Tabla 11). A la hora de comparar la toxicidad de nuevas formulaciones sería recomendable no hacerlo solamente frente a la Fungizona<sup>®</sup> que de por sí es la más tóxica de las formulaciones comercializadas, sino también compararlas frente a las formulaciones lipídicas que presentan un mejor perfil de seguridad. De entre las formulaciones que están en desarrollo preclínico, cabe resaltar los geles de formación in situ, que son capaces de mantener una liberación sostenida de AmB en el lugar de inyección durante varias semanas, que podría resultar de gran utilidad en la práctica clínica, por ejemplo, como profiláctico después de una operación quirúrgica en pacientes de riesgo o infecciones osteoarticulares.

#### **1.1.8.2. Administración por vía tópica**

La principal ventaja de la administración tópica de AmB es que se pueden evitar los efectos adversos más graves asociados con la administración parenteral tal como la nefrotoxicidad. Por lo general, las concentraciones que se alcanzan en plasma tras la administración tópica no son clínicamente relevantes ya que o bien son indetectables o bien son concentraciones subterapéuticas ( $< 0.5 \mu\text{g/mL}$ ) [192]. Esto permite no sólo tratar infecciones tópicas fúngicas y parasitarias (leishmaniasis cutánea) de una manera localizada reduciendo los efectos adversos del fármaco sino que también posibilita su uso como tratamiento profiláctico (ej. evitar infecciones en quemaduras, heridas o infecciones causadas por catéteres contaminados).

El principal reto sigue siendo poder formular la AmB en un sistema que presente las características adecuadas de:

1. Solubilidad y permeabilidad para poder penetrar a través de piel o de la córnea hasta el lugar donde se encuentre la infección.
2. Seguridad para no producir irritación, erupciones cutáneas y prurito excesivo que conlleven a la interrupción de la terapia.

Hasta ahora los mejores resultados se han obtenido con las formulaciones lipídicas. En la India, se encuentra comercializado Fungisome<sup>™</sup> gel, que consiste en una formulación liposomal que contiene AmB en una concentración de 0.1% p/p presentando un amplio

espectro de acción frente a infecciones fúngicas incluyendo los dermatofitos así como infecciones cutáneas producidas por *Leishmania* [193].

Además de los liposomas, otras formulaciones lipídicas que han demostrado incrementar la solubilidad de la AmB además de tener una buena permeabilidad tópica son:

1. Nanoemulsiones basadas en la formación de pares iónicos entre la AmB y la estearilamina [194].
2. Microtubos lipídicos formados a partir de ácido esteárico y etanolamina en los cuales la AmB es encapsulada [195].

### **Ciclodextrinas**

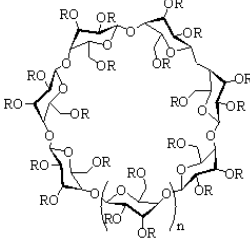
Además de excipientes lipídicos, las ciclodextrinas (CD) pueden ser un excipiente interesante a la hora de desarrollar formulaciones de uso tópico con AmB. Las CD son oligosacáridos cíclicos caracterizados por presentar una superficie hidrofílica y una cavidad interna lipofílica [196]. Son capaces de formar complejos de inclusión solubles con fármacos poco solubles. De manera que en medios acuosos, el fármaco se encuentra en un equilibrio dinámico entre las moléculas que están dentro de la cavidad lipofílica de las CD y las que se encuentran libres en el medio [197]. Las CD presentan ciertas características claves tales como:

1. Formar parte de la lista GRAS (Generally Regarded As Safe) de la FDA y ser relativamente económicas lo que permite desarrollar formulaciones coste-efectivas [198].
2. Ser capaces de incrementar la solubilidad de fármacos y reducir su degradación [196].
3. Interaccionar con ciertos componentes lipofílicos de la piel y de la córnea, siendo capaces de incrementar la permeabilidad del fármaco a través de la capa acuosa adyacente a las células favoreciendo el contacto del principio activo con las mismas [199].

Aunque existen ciertos medicamentos con CD comercializadas para la ruta parenteral, en ocasiones la administración IV de CD puede relacionarse con nefrotoxicidad, por lo que la combinación con AmB podrían agravar los efectos adversos de ésta última [200]. En la tabla 12 se recogen ciertas características esenciales a la hora de seleccionar la CD

más conveniente, tales como el diámetro de la cavidad interna, la solubilidad en agua y el precio.

**Tabla 12. Características de las ciclodextrinas (adaptado de: [198, 201]).**

CD	n	R	Peso molecular (Da)	Diámetro de la cavidad (Å)	Solubilidad en agua (mg/L)	Precio orientativo (\$US/kg)	Estructura
$\alpha$ -CD	0	H	972	4.7 – 5.3	145	45	
$\beta$ -CD	1	H	1135	6.0 - 6.5	18.5	5	
$\gamma$ -CD	2	H	1297	7.5 – 8.3	232	80	

Se podría considerar que los dos puntos críticos a la hora de formular con CD son elegir el tipo de CD apropiado que tenga una cavidad con el tamaño adecuado para interaccionar con el fármaco en cuestión, y además encontrar la proporción óptima CD: fármaco para poder solubilizar dicho principio activo.

#### 1.1.8.3. Administración por VO

Debido a su baja solubilidad ( $< 1$  mg/L a pH fisiológico), su tendencia a agregarse en medios acuosos y su baja permeabilidad (debido a su peso molecular de 924 g/mol y su log P de 0.95), su biodisponibilidad por VO es mínima [202]. De hecho, la AmB se encuentra en el grupo IV (baja solubilidad y baja permeabilidad) según el sistema de clasificación biofarmacéutica. Los comprimidos de AmB (Fungilin<sup>®</sup>) que se encuentran comercializados en ciertos países, se utilizan para el tratamiento de infecciones locales del tracto orofaríngeo y gastrointestinal causadas por un sobrecrecimiento de *C. albicans*, sin embargo, la absorción de AmB es mínima. Como principales ventajas de la administración oral de AmB se podrían citar:

1. La posibilidad de suspender el tratamiento si apareciesen reacciones adversas complicadas. En el caso de la administración intravenosa, ciertas reacciones adversas tales como reacciones anafilácticas pueden suponer un gran riesgo para la vida del paciente.

2. La vía oral facilita el cumplimiento terapéutico por parte del paciente y además permitiría reducir el tiempo de hospitalización, y por lo tanto disminuir costes indirectos de la terapia con AmB.
3. Expandir el tratamiento frente a *Leishmania* y otras micosis sistémicas en los países en vías de desarrollo, donde la hospitalización prolongada para una administración IV dificulta el acceso a la terapia.

Desde los años 50, se empezaron a realizar los primeros estudios farmacocinéticos para evaluar la absorción oral de AmB en humanos (Tabla 13). A pesar de que fueron administradas dosis muy elevadas de fármaco, las concentraciones plasmáticas obtenidas fueron muy bajas indicando una biodisponibilidad mínima. No fue hasta los años 80, cuando Ching et al., [203] observaron que cuando se administraban dosis mucho menores (del orden de miligramos), la concentración alcanzada en plasma presentaba unos valores similares, lo que parece indicar que en la absorción oral de AmB está implicado un proceso de saturación que limita considerablemente la biodisponibilidad del fármaco.

**Tabla 13. Estudios farmacocinéticos en humanos tras la administración por VO de AmB.**

Formulación	Número de pacientes	Terapia (duración)	Régimen	Recogida de muestras	Cmax plasma (µg/ml)	Ref.
AmB	5	2 g / día	Dosis única	-	0.040	[204]
	5	4 g / day (1 día)	Múltiple		0.080	
	5	10 g / day (3 días)	Múltiple		0.210	
AmB	15	4.2 g / day (2 días)	Múltiple	-	0.180	[205]
AmB solubilizada	9	5.8 g / day (10 días)	Múltiple	-	0.054	[206]
Comprimido de AmB 10 mg (Fungilin®)	3	30 mg/ day (2 días)	Múltiple	3 h después de la dosis matinal	0.068	[203]
	2	40 mg /day (2 días)	Múltiple	3 h después de la dosis matinal	0.068	



**Tabla 14. Estudios farmacocinéticos en diferentes modelos animales llevados a cabo tras la administración por VO de una dosis única de AmB.**

Formulación	Modelo animal (n° animales)	Terapia	Recogida de muestras	T max plasma (h)	Cmax plasma (µg/mL)	Concentración de AmB en tejidos (µg AmB/ g tejido)						Ref.
						Hígado	Bazo	Riñón	Pulmón	Cerebro	Corazón	
D-AmB	Rata (n=10)	1.6 – 16.7 mg/kg	-	5 - 9	0.040 – 0.100	-	-	-	-	-	-	[207]
D-AmB (Fungizona®) Albelcet® Intralipid-AmB Peceol-AmB Peceol-AmB	Rata (n=6)	5 mg/kg	24 h post-administración	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	[208]
	Rata (n=6)	50 mg/kg		8	0.0398	ND	ND	0.009	0.731	-	ND	
	Rata (n=6)	50 mg/kg		10	0.0485	ND	ND	ND	0.558	-	0.0459	
	Rata (n=6)	50 mg/kg		2	0.719	0.0134	ND	ND	43	-	ND	
	Rata (n=6)	5 mg/kg		2	1.187	0.0061	ND	ND	ND	-	ND	
	Rata (n=6)	50 mg/kg		4	1.469	0.0109	0.0765	ND	ND	-	0.0128	
AmB nanopartículas	Rata (n=3)	10 mg/kg	-	24	0.176	-	-	-	-	-	-	[209]
D-AmB (Fungizona®)	Rata (n=3)	10 mg/kg		6	0.0602							
Peceol/DSPE/PEG <sub>2000</sub> - AmB	Rata (n=6)	4.5 mg/kg	72 h post-administración	6.3	0.071	0.017	0.091	0.079	0.117	ND	ND	[210]
	Rata (n=8)	10 mg/kg		12.5	0.096	0.033	0.039	0.283	0.055	ND	ND	
AmbiOnp (SLN)	Rata (n=4)	200 mg/kg	-	9	0.124	-	-	-	-	-	-	[211]
AmB disuelta en DMSO	Rata (n=4)	200 mg/kg		12	0.142	-	-	-	-	-	-	
AmB-Cocleatos	Ratón C57BL16 (n=3)	10 mg/kg	1 h post-administración	-	-	0.04	ND	0.04	0.04	0.02	0.04	[212]
	Ratón C57BL16 (n=3)	10 mg/kg	6 h post-administración	-	-	0.72	0.6	0.96	0.96	0.48	0.1	
	Ratón C57BL16 (n=3)	10 mg/kg	24 h post-administración	-	-	0.4	0.36	0.16	0.22	ND	ND	

**Clave:** D-AmB, AmB desoxicolato; DSPE, distearoilfosfatidiletanolamina; PEG, polietilenglicol; SLN, nanopartículas sólidas lipídicas; tmax, tiempo en el que se alcanza la concentración máxima; Cmax, concentración máxima alcanzada en plasma; ND, dato no disponible.

**Tabla 15. Estudios farmacocinéticos en diferentes modelos animales llevados a cabo tras la administración de dosis múltiples de AmB por VO.**

Formulación	Modelo animal (n° animales)	Terapia (duración)	Recogida de muestras	Conc. plasma (µg/mL)	Concentración de AmB en tejidos (µg AmB/ g tejido)						Ref.
					Hígado	Bazo	Riñón	Pulmón	Cerebro	Corazón	
AmB-Cocleatos	Ratón C57BL16 (n=3)	10 mg/kg/día (10 días)	24 h después de la última dosis	ND	2.4	1.5	2.3	9.5	0.1	0.3	[212]
Peceol/DSPE/ PEG <sub>2000</sub> - AmB	Ratón BALB/c (n=8)	2.5 mg/kg bid (5 días)	12 h después de la última dosis	0.166	0.714	0.329	0.112	0.589	0.082	0.160	[213]
	Ratón BALB/c (n=8)	5 mg/kg bid (5 días)		0.168	0.957	0.751	0.323	1.449	0.112	0.289	
	Ratón BALB/c (n=8)	10 mg/kg bid (5 días)		0.390	3.151	1.920	0.928	4.076	0.160	0.626	
	Ratón BALB/c (n=6)	20 mg/kg bid (5 días)		0.519	4.728	4.194	1.589	5.048	0.184	0.621	
Peceol/DSPE/ PEG <sub>2000</sub> - AmB	Ratón BALB/c (n=5)	10 mg/kg bid (5 días)	60 h después de la última dosis	-	0.328	0.152	-	-	-	-	[214]
	VL- Ratón BALB/c (n=6)	10 mg/kg bid (5 días)		-	0.125	0.233	-	-	-	-	
	Ratón BALB/c (n=5)	20 mg/kg bid (5 días)		-	0.536	0.477	-	-	-	-	
	VL- Ratón BALB/c (n=6)	20 mg/kg bid (5 días)		-	0.171	0.428	-	-	-	-	
iCo-010 (mono- diglicéridos + PEG <sub>1500</sub> + vitamina E + AmB)	Ratón BALB/c (n=6)	2.5 mg/kg bid (5 días)	12 h después de la última dosis	0.172	0.446	0.342	0.495	0.408	0.059	0.084	[215]
	Ratón BALB/c (n=6)	5 mg/kg bid (5 días)		0.232	0.836	0.916	0.813	1.168	0.112	0.156	
	Ratón BALB/c (n=6)	10 mg/kg bid (5 días)		0.418	2.543	1.407	2.268	2.014	0.157	0.338	
	Ratón BALB/c (n=7)	20 mg/kg bid (5 días)		0.538	3.494	1.939	3.685	3.179	0.169	0.366	
Clave: DSPE, distearoilfosfatidiletanolamina; PEG, polietilenglicol; iCo-010, 60/40 (v/v) mono- y diglicéridos con vitamina E-TPGS (D- α-tocoferol polietilenglicol succinato); VL, animales infectados con leishmaniasis visceral; bid, dos veces al día; ND, dato no disponible.											

En la última década se ha hecho un gran esfuerzo para desarrollar formulaciones de administración oral con efecto a nivel sistémico, aunque por el momento hay pocos resultados prometedores. Las tablas 14 y 15 recogen diversos estudios farmacocinéticos que evalúan la absorción oral de la AmB tras una única administración o durante un régimen de dosis múltiple respectivamente. Las dos formulaciones que presentan un mejor perfil farmacocinético con mayores concentraciones en plasma y acumulación de AmB en tejidos son:

1. AmB- cocleatos, los cuales se forman a partir de bicapas de fosfolípidos que se enrollan en espiral cuando se añaden al medio cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ ) que sirven de enlace entre las capas adyacentes [216] (Figura 15 adaptada de: [217]).
2. Sistemas lipídicos autoemulsionables formados por una mezcla de lípidos tales como peceol (glicerol monoleato) y DSPE (distearoilfosfatidiletanolamina) entre otros, combinados con PEG (polietilenglicol) y vitamina E [218].

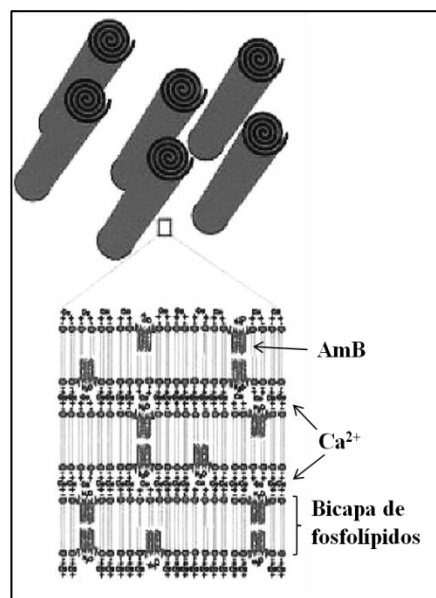


Figura 15. AmB-cocleatos

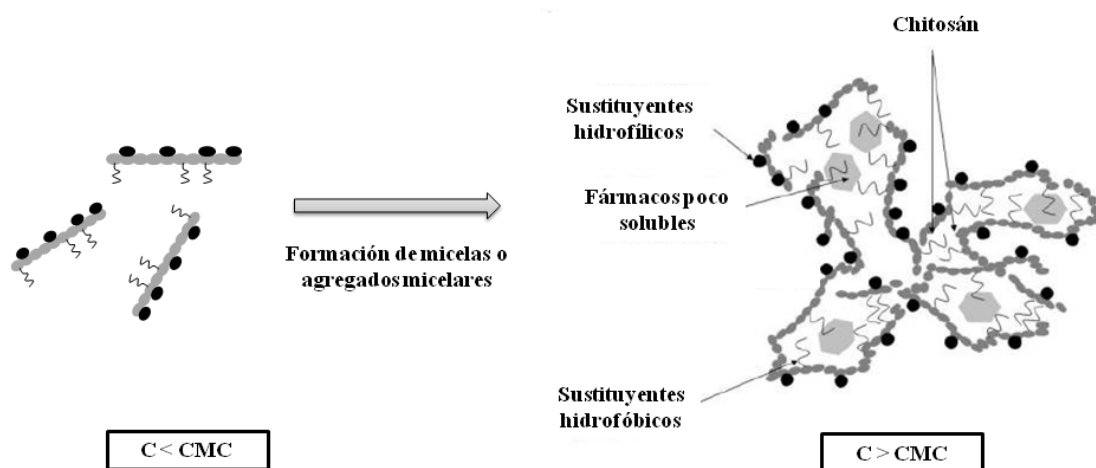
Además, cabe destacar que ambas formulaciones han demostrado tener un buen perfil farmacodinámico en diferentes modelos animales, mostrando actividad frente a *Leishmania spp.* [219], *Candida spp.* [217, 218] y *Aspergillus spp.* [220, 221].

### Chitosán modificado

A parte de formulaciones lipídicas y cocleatos, el chitosán (aminopolisacárido catiónico compuesto por unidades de glucosamina y N-acetilglucosamina, obtenido por desacetilación parcial de la quitina) y en especial derivados anfifílicos del chitosán han mostrado tener un gran potencial en la absorción oral de fármacos poco solubles [222]. Entre las ventajas que presenta el chitosán como excipiente para la vía oral se pueden citar las siguientes:

1. Es el segundo excipiente natural más abundante, obtenido a partir del caparazón de crustáceos [222].
2. Es un excipiente seguro ( $DL_{50} > 16$  g/kg por vía oral en ratones), biocompatible y biodegradable [223, 224].
3. Presenta propiedades mucoadhesivas, consecuencia de las interacciones iónicas entre los grupos amino catiónicos del chitosán ( $pK_a = 6.5$ ) y grupos cargados negativamente tales como el ácido siálico ( $pK_a = 2.6$ ) que se encuentran formando parte del mucus secretado por los enterocitos del intestino [223].
4. Puede incrementar la permeabilidad de fármacos a través de la barrera gastrointestinal, mejorando su biodisponibilidad oral [225].
5. Presenta propiedades antimicrobianas y antifúngicas [226].

Sin embargo, el uso del chitosán se ve limitado debido a su baja solubilidad a pH fisiológico 7.4 [227]. Para hacer frente a este problema, se han sintetizado diferentes derivados químicos a partir del chitosán, donde cabe destacar los derivados anfifílicos por sus propiedades para formar micelas o agregados micelares en medios acuosos [228] (Figura 16). La introducción de grupos hidrofílicos (ej.  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ ) e hidrofóbicos (ej. ácidos grasos) ha demostrado mejorar la eficiencia de encapsulación de fármacos poco solubles así como potenciar su permeabilidad a través de diferentes barreras biológicas [229].



**Figura 16.** Formación de micelas o agregados micelares en medios acuosos a partir de derivados anfifílicos del chitosán (adaptado de: [229]). Cuando el derivado anfifílico se encuentra en medios acuosos a una concentración superior a su concentración crítica micelar (CMC), es capaz de formar micelas o agregados micelares, que facilitan la solubilización de fármacos poco solubles.

Además, otra modificación a destacar es la alquilación exhaustiva del grupo amino, dando lugar a chitosán cuaternizado el cual presenta un perfil de solubilidad en medios acuosos mucho mejor que el chitosán y ha demostrado ser más eficiente a la hora de mejorar la absorción oral de fármacos [230].

#### **1.1.8.4. Otras vías de administración**

Además de las vías de administración antes descritas, la administración pulmonar de AmB parece tener buenos resultados tanto en el tratamiento local de infecciones fúngicas invasivas como en profilaxis en pacientes de alto riesgo [231]. Las formulaciones comercializadas para la vía parenteral pueden ser usadas como aerosoles para incrementar la deposición y retención del fármaco a nivel pulmonar [232]. Las formulaciones lipídicas parecen ser más efectivas que la AmB convencional. Por ejemplo, en estudios comparativos entre las diferentes formulaciones se ha observado que con el Abelcet<sup>®</sup> se pueden conseguir concentraciones en el pulmón 3.7 veces superiores que con la Fungizona<sup>®</sup>, siendo más efectivo como profiláctico frente a *Aspergillus* [233]. Entre los avances para la vía pulmonar se podrían destacar nanomicelas de chitosán recubiertas por ácido esteárico [234] o nanodiscos compuestos a base de fosfolípidos y apolipoproteína A-I [235].

La administración intranasal de AmB ha sido utilizada para el tratamiento de rinosinusitis crónica, ya que la infección fúngica puede coexistir con la infección bacteriana [236]. Sin embargo, la eficacia del tratamiento intranasal con AmB es contradictoria; mientras que algunos estudios confirman que la administración intranasal de AmB reduce la inflamación de la mucosa nasal [237], en otros estudios no se encontró ninguna mejoría en los síntomas clínicos de los pacientes [238].

## 1.2. Enfermedades tratadas con anfotericina B

### 1.2.1. Leishmaniasis

#### 1.2.1.1. Epidemiología

Se estima que en el mundo hay cerca de 12 millones de personas infectadas por *Leishmania* [239] y cerca de 1,5 millones son infectadas cada año [240]. Muchos de los casos no son notificados, de ahí que la información epidemiológica sobre esta enfermedad sea limitada. Aproximadamente cada año ocurren entre 0.2 – 0.4 millones de casos por leishmaniasis visceral (VL) y entre 0.7 – 1.2 millones por leishmaniasis cutánea (CL) [240]. Por lo tanto, en poco más de un minuto, una persona será infectada por VL y tres por CL.

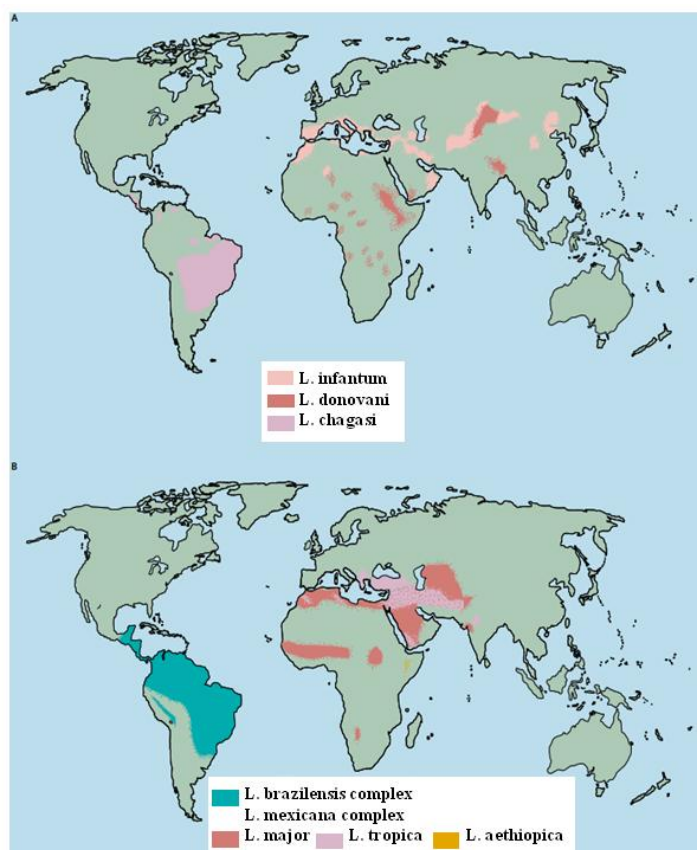


Figura 17. Distribución geográfica de VL (A) y CL (B) (adaptado de: [241])

Actualmente, la enfermedad se encuentra distribuida en cuatro continentes siendo endémica en 88 países de los cuales 72 se trata de países en vías de desarrollo (Figura 17):

- más del 90% de los casos de VL a nivel mundial se concentran en cinco países: India, Bangladés, Sudán, Etiopía y Brasil;
- más del 90% de los casos de leishmaniasis mucocutánea (MCL) tienen lugar en Bolivia, Brasil y Perú;
- las tres regiones más afectadas por CL son: la cuenca del Mediterráneo, las Américas y la parte occidental de Asia. Los diez países con mayor número de casos donde se concentra alrededor de un 70 – 75% de la incidencia de CL son: Afganistán, Argelia, Colombia, Brasil, Irán, Siria, Etiopía, el Norte de Sudán, Costa Rica y Perú [240].

Según Alvar et al., la incidencia de VL en España entre los años 2004 – 2008 fue una de las más altas de Europa (con 114 casos notificados y entre 140 – 210 casos estimados) junto con Italia, Grecia y Albania; sin embargo, ningún caso de CL fue registrado durante ese periodo en España [240]. En el último trimestre de 2010 comenzó a detectarse un aumento en el número de casos de leishmaniasis notificados con respecto a años anteriores, debido fundamentalmente, a una acumulación de casos detectada en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid [242]. Desde el 1 de julio de 2009 hasta el 2 de octubre de 2012 se han notificado 471 casos de leishmaniasis (principalmente localizados en Fuenlabrada, Leganés, Getafe y Humanes de Madrid), con una tasa de incidencia de: 22.11 casos por 100 000 habitantes. El 36.7% de los enfermos asociados al brote presentaron VL y el 63.3% restante CL. En las muestras en las que se ha realizado la tipificación, el parásito fue identificado como *L. infantum* [242].

Por otro lado, la leishmaniasis canina es endémica en 11 países de la cuenca mediterránea: Portugal, España, Francia, Italia, Malta, Croacia, Bosnia, Montenegro, Albania, Grecia y Chipre [243]. Fuera de estos países, los casos son esporádicos y generalmente debidos a perros que han viajado a un área endémica (Figura 18). Una estimación conservadora a partir de los datos serológicos sugiere que en estos países, están infectados cerca de 2.5 millones de perros [243]. Las áreas endémicas se están expandiendo, llegando a existir una prevalencia en algunas áreas de entre el 63 – 80%, sin embargo, la aparición clínica de la enfermedad es mucho menor [244]. La amplia prevalencia de perros infectados tiene una relevancia dual: por una parte supone la causa de muerte de muchos de estos animales y por otra, incrementa el riesgo de transmisión del parásito al ser humano.

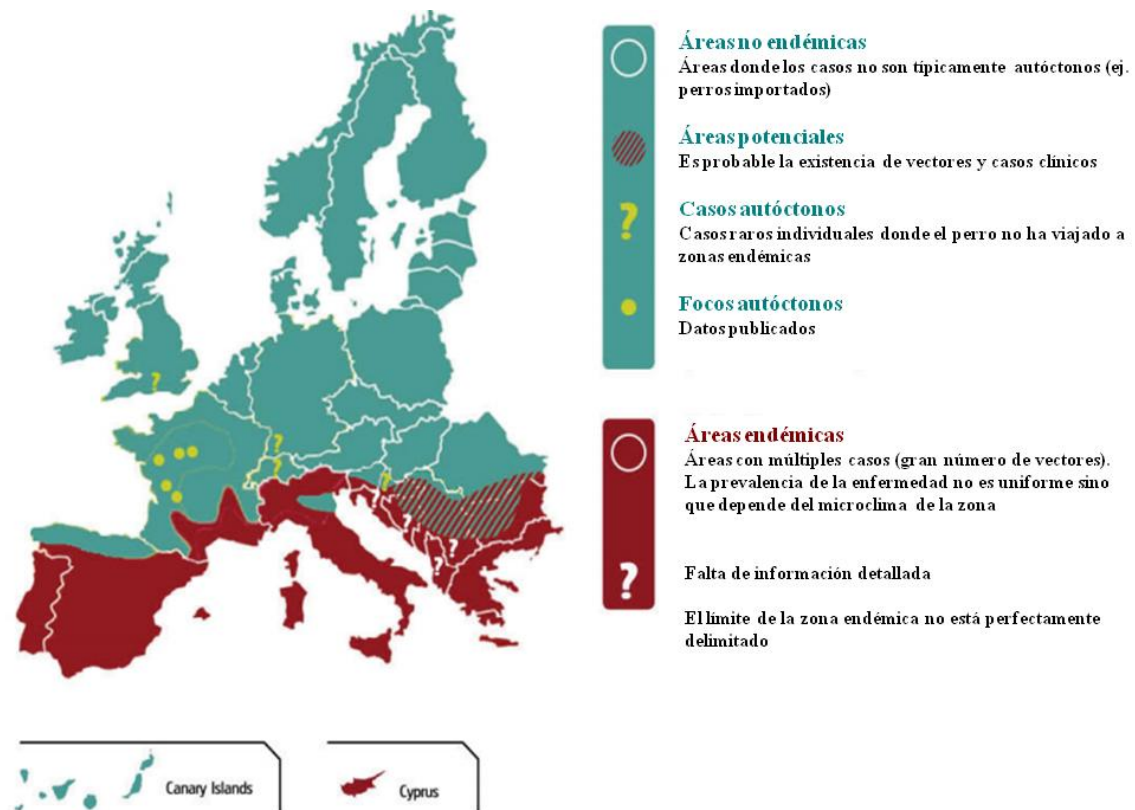


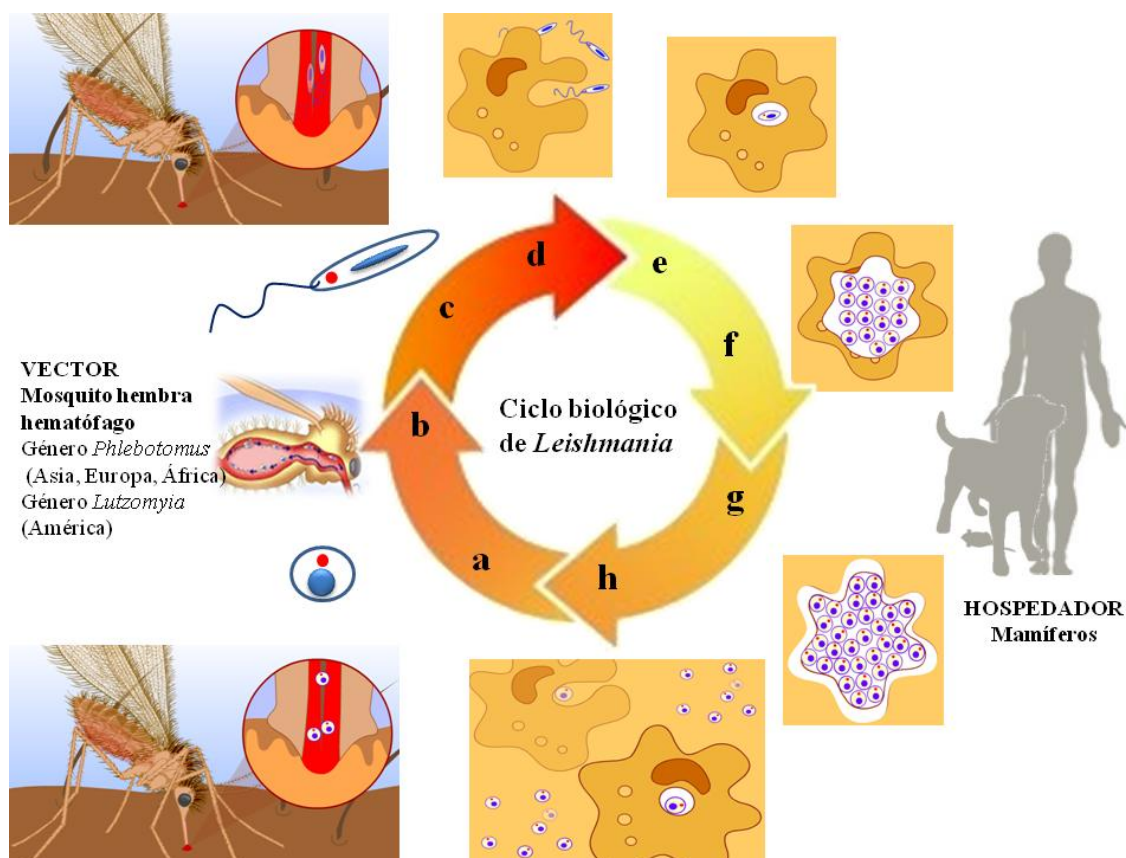
Figura 18. Distribución geográfica de la leishmaniasis canina producida por *L. infantum* en Europa [245]

### 1.2.1.2. Ciclo biológico

La leishmaniasis es una enfermedad transmitida por la picadura de flebotomos hembra infectantes (del género *Phlebotomus* en Europa, Asia y África y del género *Lutzomyia* en América). Es causada por protozoos intracelulares del género *Leishmania* [246]. El ciclo empieza cuando el flebotomo toma sangre de un vertebrado infectado, para alimentarse, e ingurgita sangre infectada con amastigotes (Figura 19 a). Los amastigotes se liberan en el intestino y se adhieren a las microvellosidades de la pared luminal. La transformación del amastigote a promastigote metacíclico infectante tiene lugar durante las siguientes 24 a 48 horas (Figura 19 b) [247]. Los promastigotes metacíclicos infectantes se anclan preferentemente en la hipofaringe y probóscide del mosquito, listos para infectar a un nuevo hospedador [248]. Cuando el mosquito infectado pica a un hospedador, le inocular entre 10 y 1000 promastigotes los cuales penetran en la dermis (Figura 19 c). La saliva del mosquito tiene un papel clave en el establecimiento de la infección, ya que reduce la producción de óxido nítrico (NO) por los macrófagos activados [249]. Los promastigotes no migran activamente hacia los macrófagos, sino que permanecen en el espacio intercelular y activan el complemento por una vía



alternativa, que da lugar a la acumulación de neutrófilos y macrófagos [247]. Aunque muchos de los promastigotes metacíclicos libres en el tejido dérmico son destruidos por los leucocitos polimorfonucleares, otros se adhieren (preferentemente por el flagelo) y penetran en los macrófagos, probablemente consecuencia de la fagocitosis o por invasión del propio parásito (Figura 19 d) [249].



**Figura 19. Ciclo biológico de *Leishmania* (adaptada de:[250])**

El promastigote es englobado dentro de una vacuola parasitófora donde el macrófago intenta eliminarlo por medio de la secreción de ROS, hidrolasas lisosomales, NO y lisozimas (Figura 19 e) [248]. Si el parásito consigue evadir la respuesta inmunológica del macrófago, se transforma en amastigote en un periodo de 3 a 4 horas, permaneciendo en estado estacionario aproximadamente durante unas 36 horas, tras las cuales comienza a multiplicarse por fisión binaria (Figura 19 f) [249]. La cantidad de amastigotes puede llegar hasta 200, lo que provoca la distensión y ruptura del macrófago (Figura 19 g) [251]. Los amastigotes libres entran en nuevas células del sistema fagocitario mononuclear, donde nuevamente se multiplican o bien se diseminan a través de la piel o de la circulación cutánea hasta alcanzar las mucosas, o son arrastrados por el torrente sanguíneo y linfático, junto a los macrófagos circulantes, para

localizarse en territorios orgánicos ricos en células macrofágicas fijas, principalmente, médula ósea, hígado y bazo (Figura 19 h) [247]. El ciclo se reanuda cuando el flebotomo vuelve a picar a un hospedador para alimentarse de sangre.

### 1.2.1.3. Respuesta inmunitaria

La respuesta inmunitaria del hospedador frente a *Leishmania* es clave para determinar la progresión o eliminación de la enfermedad. Fundamentalmente, la respuesta inmunitaria es de tipo celular, mediada por células T (Figura 20). Aunque el mecanismo en humanos no está perfectamente elucidado, parece ser que el incremento de células Th1 se relaciona con una respuesta eficaz [252]. Esta respuesta cursa con un incremento en IL-2, TNF- $\alpha$  y  $\gamma$ -IFN, las cuales inducen una activación de los macrófagos. El  $\gamma$ -IFN induce la expresión de la óxido nítrico sintetasa que da lugar a la producción de NO y el TNF- $\alpha$  fomenta la actividad leishmanicida de los macrófagos, jugando un papel importante en la eliminación del parásito [253, 254].

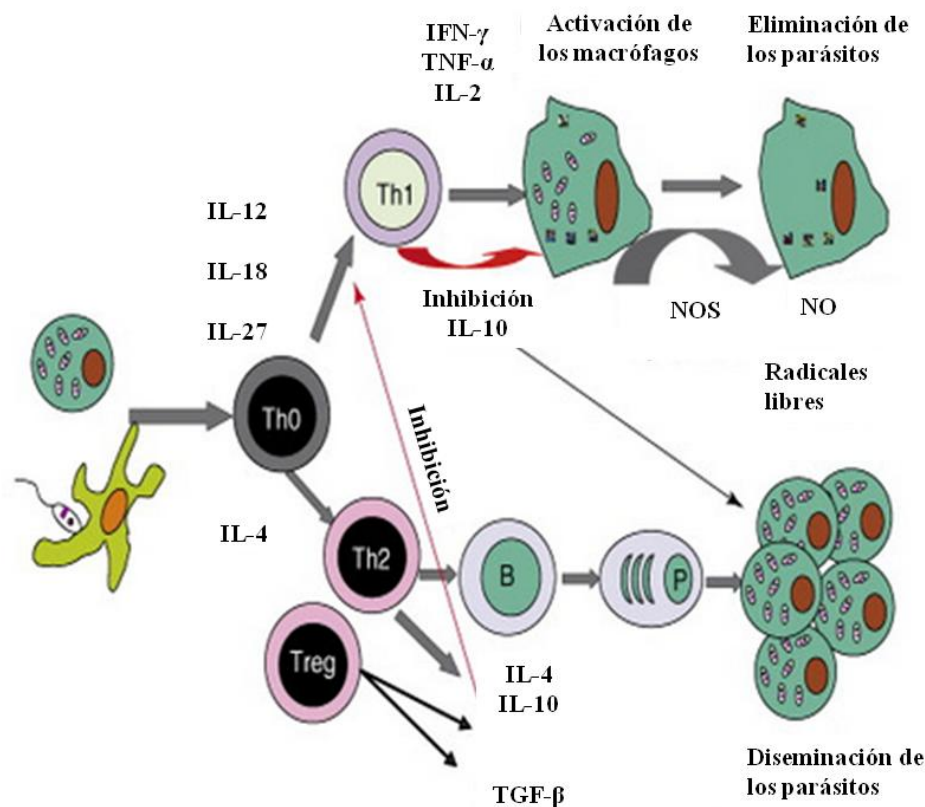
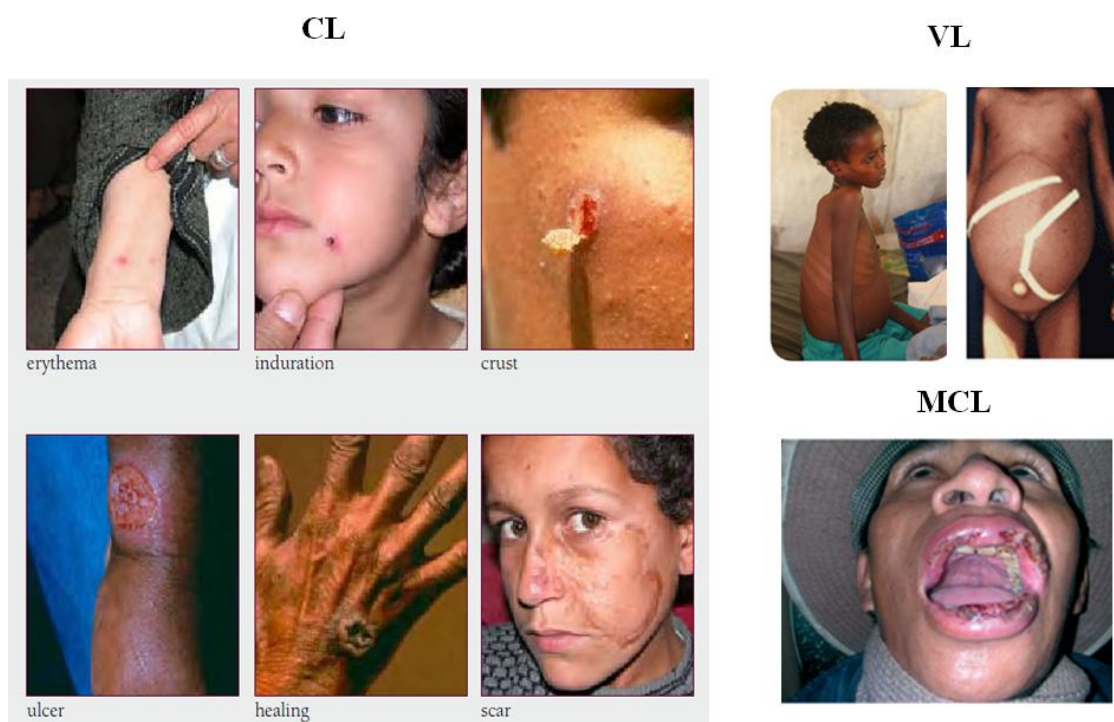


Figura 20. Respuesta inmunitaria del hospedador tras la infección por *Leishmania* (adaptado de: [244]). Clave: TNF- $\alpha$ , Factor de necrosis tumoral alfa; IFN- $\gamma$ , gamma interferón; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintetasa; TGF- $\beta$ , factor de crecimiento transformante beta.

Por el contrario, la síntesis temprana de IL-4 está relacionada con el desarrollo de la respuesta Th2, la cual estimula la inmunidad humoral e inhibe la respuesta Th1 y hace que el macrófago sea poco susceptible a la activación por  $\gamma$ -IFN. La IL-4 disminuye la producción de IL-12 y  $\gamma$ -IFN y además inhibe la producción de NO por los macrófagos [255]. El TGF- $\beta$  inhibe la inducción de la óxido nítrico sintetasa y la IL-10 inhibe la respuesta Th1 [244]. La estimulación de la respuesta humoral trae consigo la activación de los linfocitos B, con la consiguiente formación de anticuerpos (principalmente IgG) que son incapaces de contrarrestar al parásito por tener una localización intracelular, de manera que la enfermedad se disemina [255]. Además, el exceso de producción de anticuerpos da lugar a la formación de inmunocomplejos circulantes que conllevan por un lado a patologías tales como la vasculitis, poliartritis y glomerulonefritis y por otro lado da lugar a anemia y trombocitopenia y facilitan la fagocitosis de los amastigotes, potenciando su diseminación en el hospedador [256, 257].

#### 1.2.1.4. Clínica

Las diferentes especies del género *Leishmania* según su localización en el hospedador y el tipo de respuesta inmunitaria estimulada dan lugar a diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad (Figura 21).



En el hombre podrían clasificarse en:

1. VL, también conocida como Kala azar, la cual si no es tratada el porcentaje de mortalidad es muy alto (cerca del 100%) [258]. El periodo de incubación suele durar entre 2 y 6 meses [259]. Los síntomas típicos son: fiebre, debilidad, pérdida de peso, anemia, hepato y esplenomegalia (consecuencia de la invasión parasítica del bazo e hígado) [259].
2. CL, se caracteriza por la aparición de una pequeña inflamación y rubor (eritema) en el lugar de la infección, que va aumentando de tamaño, y después de 3 ó 4 semanas, se desarrolla una úlcera normalmente indolora parecida a un volcán. Esta lesión puede curarse después de 6 ó 12 meses quedando una marcada cicatriz y relativa desfiguración, produciendo estigmatización social [261].
3. MCL, esta manifestación clínica es menos común que las anteriores y normalmente ocurre en las personas que han padecido CL (del 1 al 10%). Se caracteriza por eritemas y úlceras en la nariz, a lo que le sucede, inflamación, perforación y destrucción del tabique nasal que puede obstruir la faringe y /o laringe, produciendo una discapacidad importante en el paciente además de estigmatización por parte de la sociedad [246, 261].
4. Leishmaniasis cutánea difusa, caracterizada por presentar una lesión ulcerante en nódulos distribuidos por todo el cuerpo.

En el caso de la leishmaniasis canina, las manifestaciones clínicas son una combinación de los signos clínicos que se producen en la infección humana, siendo las más características: caquexia, fiebre, linfadenopatías, hepato y esplenomegalia (consecuencia de la invasión parasítica de estos órganos), glomerulonefritis y rigidez en las articulaciones (debido a la precipitación de inmunocomplejos circulantes), anemia, epistaxis, hematuria, diarrea hemorrágica, atrofia muscular, onicogrifosis (alteración en el crecimiento de las uñas) lesiones en la piel (dermatitis exfoliativa, ulcerativa, nodular o postular) y a nivel ocular (uveítis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, blefaritis) (Figura 22) [244]. Sin embargo, hay que tener en cuenta que no todos los perros con serología positiva (con anticuerpos frente a *Leishmania*) desarrollan síntomas clínicos.





**Figura 22. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis canina [244]; (a) queratoconjuntivitis con dermatitis periocular; (b) dermatitis exfoliativa; (c) epistaxis; (d) onicogriphosis; (e) lesión ulcerativa.**

#### **1.2.1.5. Tratamiento frente a *Leishmania***

En las últimas décadas, muy pocos nuevos fármacos y/o nuevas formulaciones han sido comercializadas para el tratamiento frente a *Leishmania*; de hecho, ninguno de los tratamientos actuales es idóneo, debido a problemas de: toxicidad, aparición de resistencias, alto coste, larga duración de la terapia o inadecuada vía de administración (teniendo en cuenta que el acceso al hospital no es factible para muchos pacientes) (Tabla 16) [262]. Esto hace que muchos de los pacientes no concluyan el tratamiento lo que da lugar a un incremento en la aparición de resistencias. Para prevenir este problema, hacer la terapia más corta e incrementar la eficacia, se recurre a la combinación de fármacos [263].

Durante muchos años, el fármaco de elección han sido los antimoniales pentavalentes tales como: estibogluconato de sodio (Pentostan<sup>®</sup>) y antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>), los cuales presentan una eficacia variable frente a VL y CL y requieren administración parenteral (IM o IV); además presentan un elevado número de efectos adversos tales como: cardiotoxicidad, pancreatitis y nefrotoxicidad siendo necesaria la hospitalización con el fin de monitorizar al paciente durante la administración [263].

Tabla 16. Tratamiento farmacológico frente a *Leishmania* [264]

Enfermedad	Fármaco	Dosis (vía de administración)
<b>VL</b> <b>Fármaco de elección</b>	AmB liposomal (AmBisome®)	3 mg/kg/día x 1-5, 14 y 21 días (IV)
	Estibogluconato de sodio (Pentostan®)	20 mg/kg/día x 28 días (IV o IM)
	Miltefosina (Impavido®)	2.5 mg/kg/día x 28 días (VO)
<b>VL</b> <b>Fármaco alternativo</b>	Antimoniato de meglumina (Glucantime®)	20 mg/kg/día x 28 días (IV o IM)
	AmB convencional (Fungizona®)	1 mg/kg/día x 15-20 días o 1 mg/kg/48 h x 8 semanas (IV)
	Paromomicina	15 mg/kg/día x 21 días (IM)
<b>CL</b> <b>Fármaco de elección</b>	Estibogluconato de sodio (Pentostan®)	20 mg/kg/día x 20 días (IV o IM)
	Antimoniato de meglumina (Glucantime®)	20 mg/kg/día x 20 días (IV o IM)
	Miltefosina (Impavido®)	2.5 mg/kg/día x 28 días (VO)
<b>CL</b> <b>Fármaco alternativo</b>	Paromomicina	Administración tópica 2 veces al día x 10-20 días
	Pentamidina	2-3 mg/kg/día ó cada 48 h x 4-7 dosis
<b>MCL</b> <b>Fármaco de elección</b>	Estibogluconato de sodio (Pentostan®)	20 mg/kg/día x 28 días (IV o IM)
	Antimoniato de meglumina (Glucantime®)	20 mg/kg/día x 28 (IV o IM)
	AmB convencional (Fungizona®)	0.5-1 mg/kg/día ó cada 48 h x 8 semanas (IV)
	Miltefosina (Impavido®)	2.5 mg/kg/día x 28 días (VO)

Debido al aumento en las resistencias con los antimoniales, la terapia con AmB ha pasado a ser el tratamiento de elección frente a VL. La AmB convencional al ser mucho menos costosa que la AmB liposomal, se utiliza en países con menos recursos económicos, como la India (a pesar de que presenta alta toxicidad a nivel renal y requiere una administración IV muy lenta para prevenir los efectos adversos asociados con la administración); mientras que la AmB liposomal se utiliza en los países desarrollados, ya que tiene una eficacia leishmanicida muy alta y la toxicidad es mucho menor en comparación con la AmB convencional. La OMS ha negociado un precio para intentar hacer más asequibles este tipo de fármacos en países con alta prevalencia de leishmaniasis y pocos recursos económicos (Tabla 17). Aún así, el tratamiento con AmB liposomal sigue siendo relativamente elevado y tiene otros problemas adyacentes tales como la administración parenteral y la falta de estabilidad a altas temperaturas (siendo necesario mantener la cadena del frío que incrementa aún más su coste) [262].

La miltefosina es el único tratamiento de administración oral frente a *Leishmania*. Presenta un buen perfil de eficacia y aunque su toxicidad no es muy elevada, sin embargo, es teratogénica. Otro problema de este fármaco es el rápido desarrollo de resistencias [265].

La paromomicina se utiliza en el tratamiento de la VL y CL, aunque su eficacia es variable frente a VL. La principal ventaja es su bajo coste en comparación con el resto de terapias [266]. La pentamidina se empezó usando como segunda línea de tratamiento frente a VL, sin embargo, debido a su alta toxicidad y aparición de resistencias ha quedado relegada a un segundo plano, principalmente para tratamientos combinados [262, 263].

**Tabla 17. Comparación de la eficacia, toxicidad, resistencia y precio de los diferentes tratamientos frente a *Leishmania* [262, 266, 267]**

Fármaco	Eficacia (a los 6 meses)	Resistencia	Toxicidad	Precio (\$) del tratamiento de VL acordado por la OMS para un paciente de 70 kg
Antimoniales pentavalentes	35-95% dependiendo del área	Común (> 60% en algunas zonas como en Bihar, en la India)	+++ Cardiotoxicidad, pancreatitis, nefrotoxicidad y hepatotoxicidad	112 - 119
AmB convencional	> 90%	Solo en algunas cepas de laboratorio	+++ Nefrotoxicidad	40
AmB liposomal	> 97%	No está documentado	+/- Toxicidad relacionada con la administración, tales como temblores y rigidez	504
Miltefosina	94-97%	Rápida aparición de resistencias	+ Toxicidad gastrointestinal, nefrotoxicidad, heptaotoxicidad, teratogenicidad	130 - 300
Paromomicina	94% (India) 46-85% (África según la dosis)	Solo en algunas cepas de laboratorio	+ Nefrotoxicidad, ototoxicidad, hepatotoxicidad	15

En lo que respecta al tratamiento de la leishmaniasis canina, el arsenal terapéutico es similar al de los humanos; por lo general, en la mayoría de los perros el cuadro clínico mejora tras el tratamiento, pero no se produce la “curación parasitológica” y en muchos casos pueden aparecer recaídas siendo la tendencia actual la combinación de fármacos con actividad leishmanicida. De todos los fármacos disponibles, los leishmanicidas más utilizados son los antimoniales pentavalentes seguidos de la AmB; mientras que el alopurinol es el leishmanioestático por excelencia debido a su inocuidad y eficacia [268].

Durante los últimos años se está haciendo un gran esfuerzo para desarrollar una vacuna efectiva frente a *Leishmania*, aunque por el momento la eficacia parece ser relativa

siendo complejo extrapolar los resultados de modelos animales a humanos [269]. Sin embargo, recientemente, se ha comercializado la primera vacuna frente a la leishmaniasis canina, CaniLeish<sup>®</sup>, constituida por proteínas secretadas y excretadas por *L. infantum*. Ha demostrado disminuir el riesgo de desarrollar una infección activa y una enfermedad sintomática después del contacto con este parásito, sin embargo, parece no tener ningún beneficio en perros que ya han desarrollado la enfermedad [270].

## **1.2.2. Micosis**

### **1.2.2.1. Micosis invasivas**

Tanto la frecuencia como la variedad de infecciones fúngicas invasivas han aumentado considerablemente durante las últimas tres décadas. Las causas principales de este hecho están relacionadas con el uso indiscriminado de antibióticos, el empleo de potentes fármacos inmunosupresores y antineoplásicos, el aumento de pacientes inmunodeprimidos (HIV y transplantados entre otros) así como cambios en la práctica médica en donde cada vez es más común la utilización de catéteres invasivos además de otros sistemas tales como: ventilación asistida, hemodiálisis, alimentación parenteral, etc [271, 272].

Aunque las causas más comunes de infecciones sistémicas fúngicas son debido a *C. albicans*, *A. fumigatus* y *C. neoformans*, la tasa de infección por otro tipo de hongos oportunistas (*Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Fusarium spp.*) va en aumento. Además es real el hecho de que cada vez aparecen nuevos hongos patógenos resistentes a la terapia antifúngica de la que se dispone actualmente, siendo preocupante la aparición de infecciones invasivas por ciertos hongos patógenos como *Acremonium*, *Scedosporium*, *Paecilomyces*, y *Trichoderma spp.* [273].

Aunque existen más de 175 especies dentro del género *Aspergillus*, solamente *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* y *A. nidulans* son las especies asociadas con infecciones invasivas [274]. Las esporas son fácilmente liberadas a la atmósfera y por inhalación, alcanzan los alveolos pulmonares, siendo el aire la principal vía de transmisión. La aspergilosis invasiva se da casi exclusivamente en pacientes inmunocomprometidos, siendo *A. fumigatus* el responsable de más del 90% de las infecciones fúngicas transmitidas por la vía aérea [273]. La cuarta causa de infecciones nosocomiales sistémicas es producida por *Candida spp.* La incidencia anual de



candidemia oscila entre los 6 - 23 casos/ 100 000 habitantes en América siendo algo menor en Europa entre 2.5 - 11 casos/ 100 000 habitantes [275, 276]. Aunque se han identificado más de 17 especies de *Candida* como agentes etiológicos causantes de infecciones sistémicas nosocomiales, cerca del 95% son producidas por: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, y *C. tropicalis*. La mayoría de las candidemias se produce en pacientes de la UCI o aquellos que se someten a cirugías abdominales [273]. El coste global sanitario que generan las candidiasis es 2.5 veces mayor que las infecciones por *Aspergillus*; sin embargo, el coste por paciente es 2 – 3 veces superior en las aspergilosis que en las candidiasis sistémicas [277]. Por último comentar que las infecciones causadas por *Cryptococcus* se producen por la inhalación de las levaduras que entran en las vías respiratorias y permanecen en un estado latente hasta que se reactivan en pulmones y nódulos linfáticos, siendo la segunda causa más frecuente de infecciones fúngicas oportunistas en pacientes con VIH [273].

#### 1.2.2.2. Micosis cutáneas

En las micosis superficiales, los hongos colonizan las capas más externas queratinizadas de la piel, el cabello y las uñas, desencadenando una respuesta inmunitaria escasa o nula por parte del hospedador sin ser destructivas y, generalmente su diagnóstico y tratamiento son relativamente sencillos [124]. Las micosis cutáneas son enfermedades muy frecuentes en nuestro medio y su distribución es universal. La incidencia de esta enfermedad se halla en progresivo aumento y se estima que cerca del 20 - 25% de la población padece una infección micótica cutánea, siendo los principales responsables los dermatofitos en sus 3 géneros anamorfos (*Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*), así como las levaduras de los géneros *Candida* y *Malassezia* [278]. La aparente simplicidad etiológica sin embargo, se ve complicada por las numerosas formas de presentación clínica que adoptan las dermatofitosis y las candidiasis cutáneas [279].

Especial mención cabe hacer a las micosis oculares, las cuales son debidas a hongos oportunistas que, en condiciones normales, no son patógenos. Los hongos como tal no penetran si el epitelio corneal está intacto, normalmente necesitan algún tipo de entrada que puede ser causada por un traumatismo o un defecto epitelial; sin embargo, una vez dentro de la córnea, son capaces de proliferar muy rápidamente, especialmente frente a un organismo debilitado inmunológicamente (ej. diabetes, cáncer, HIV, terapia

prolongada con corticoides o antibióticos), siendo *Candida* uno de los principales patógenos que producen infecciones oculares [280]. Según la OMS, las enfermedades de la córnea son la principal causa tanto de pérdida de visión como de ceguera, tras las cataratas [281]. De hecho, la queratitis fúngica es la segunda causa más común de ceguera en los países desarrollados y se podría decir que la principal en Asia, ya que es uno de los tipos de queratitis más difíciles de diagnosticar y tratar que puede complicarse con facilidad resultando en endoftalmitis [280, 281]. Las infecciones fúngicas oculares predominantes son causadas por *Candida*, *Fusarium*, *Scedosporium* y *Aspergillus* las cuales pueden conducir a una seria ulceración de la córnea por lo cual deben ser tratadas rápidamente [282].

### 1.2.2.3. Tratamiento antifúngico

A la hora de tratar las micosis cutáneas, es necesario utilizar no solamente medidas farmacológicas sino también todas las medidas encaminadas a la prevención y mejora del proceso terapéutico. Los antifúngicos que habitualmente se emplean en clínica, se utilizan principalmente por vía tópica dejando los preparados sistémicos para el tratamiento de infecciones graves, invasivas o cuando la respuesta terapéutica a los tratamientos tópicos es insuficiente. Los antifúngicos tópicos se clasifican en las siguientes familias farmacológicas [279]:

1. Polienos: AmB y nistatina.
2. Azoles: clotrimazol, miconazol, econazol, ketoconazol, tioconazol, bifonazol, butoconazol, eberconazol, fenticonazol, flutrimazol, oxiconazol, sertaconazol.
3. Alilaminas: naftifina, terbinafina.
4. Morfolinas: amorofilina.
5. Miscelánea: ciclopiroxolamina, tolnaftato.

En lo que respecta al tratamiento de infecciones fúngicas oculares, la AmB es el fármaco de elección en infecciones graves, como en queratitis producidas por levaduras, mientras que la natamicina es el fármaco usado como primera línea en queratitis por hongos filamentosos. La administración IV de AmB para el tratamiento de infecciones oculares es efectiva aunque la nefrotoxicidad es la principal limitación de esta terapia [282]. La administración ocular de AmB por lo general es bien tolerada y debido a su

carácter hidrófobo suele presentar buena penetración a través de la cornea (cuando existe una infección) en comparación con otros fármacos utilizados (Tabla 18).

Presenta un espectro de acción superior a otros tratamientos con baja incidencia de resistencias [280]. Sin embargo, debido a su baja solubilidad acuosa, no existe ninguna formulación comercializada para la vía ocular, ya que a la concentración necesaria para poder ser efectiva, incrementa el riesgo de que el fármaco precipite lo que trae consigo problemas de irritación conjuntival [282].

**Tabla 18. Tratamiento ocular antifúngico [280]**

<b>Fármaco</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>AmB</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Buena penetración ocular</li> <li>- Amplio espectro de acción frente a <i>Candida spp.</i> y <i>Aspergillus spp.</i></li> <li>- Rara aparición de resistencias</li> <li>- Larga semivida</li> <li>- Bien tolerada a nivel ocular aunque puede causar problemas de irritación</li> <li>- Además del efecto fungicida tiene propiedades inmunoadyuvantes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Baja solubilidad acuosa y alta unión a proteínas plasmáticas</li> <li>- No existe una formulación para administración ocular</li> <li>- Nefrotoxicidad tras administración IV</li> </ul>
<b>Natamicina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Comercializada como formulación ocular</li> <li>- Aplicación tópica eficaz</li> <li>- Bien tolerada a nivel ocular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sólo es efectiva tras administración tópica</li> </ul>
<b>Fluconazol</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alta solubilidad acuosa</li> <li>- Baja unión a proteínas plasmáticas</li> <li>- Alta biodisponibilidad ocular</li> <li>- Existe formulación comercializada para la vía ocular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Menor actividad frente a <i>C. albicans</i>, <i>C. glabrata</i> y <i>C. krusei</i></li> <li>- Pobre penetración a nivel ocular</li> <li>- Muchas interacciones con otros fármacos</li> <li>- Escasa semivida a nivel ocular</li> </ul>
<b>Ketoconazol</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Buena biodisponibilidad ocular tras administración VO</li> <li>- Existe formulación comercializada para la vía ocular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alta unión a proteínas plasmáticas</li> <li>- Corta semivida a nivel ocular</li> <li>- Se requiere un pH ácido para la absorción</li> </ul>
<b>Itraconazol</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Existe formulación comercializada para la vía ocular</li> <li>- Larga semivida</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Baja solubilidad acuosa y alta unión a proteínas plasmáticas</li> <li>- Escasa penetración corneal</li> <li>- Visión borrosa tras la administración ocular junto con sensación de molestia y ojo seco</li> </ul>
<b>Miconazol</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bajo peso molecular</li> <li>- Buena penetración corneal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensación de molestia, de quemazón e irritación tras la administración ocular</li> <li>- Baja solubilidad acuosa y alta unión a proteínas plasmáticas</li> <li>- Produce fotosensibilidad</li> </ul>
<b>Voriconazol</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Amplio espectro de acción</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Interacción con muchos fármacos</li> <li>- Alteraciones visuales (visión borrosa, sensibilidad a la luz)</li> </ul>



AmB¿Cómo?¿Dónde?¿Por y para qué? Anfotericina B características físico químicas distribución toxicidad hemolítica nefrotoxicidad **2. Justificación**  
distribución en SRE **e hipótesis,**  
toxicidad hemolítica **objetivos y**  
fagocitosis bazo **planteamiento**

Beagles hipotensión ciclodextrinas citosán modificado anfotericina políagregado tamaño de partícula absorción oral toxicidad hemolítica biodistribución prolongada circulación plasmática amplio volumen de distribución tamaño de partícula anfotericina B plasmática amplio volumen de distribución tamaño de part



## **2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO**

### **2.1. Justificación e hipótesis**

Las formulaciones lipídicas comercializadas de AmB son las que presentan un mejor perfil de seguridad en comparación con la AmB convencional; sin embargo, el coste del tratamiento es bastante elevado, limitando el uso de AmB en los países con menos recursos económicos en donde hay una mayor prevalencia de enfermedades potencialmente tratables con AmB. Por esta razón, el desarrollo de una formulación de AmB por vía parenteral que sea segura y al mismo tiempo coste-efectiva permitiría facilitar el acceso al tratamiento con AmB en muchos países y además podría ser utilizada a nivel veterinario (teniendo en cuenta la alta prevalencia de leishmaniasis canina en la cuenca del mar Mediterráneo), donde el alto coste de las formulaciones lipídicas de AmB es también una de las razones que limita su uso. En estudios anteriores llevados a cabo por nuestro grupo de investigación se obtuvieron resultados prometedores en modelos de ratón y hámster con AmB en forma poliagregada [53, 58], por este motivo es interesante poder evaluar si en especies de mayor tamaño como el perro, la AmB poliagregada presenta el mismo perfil farmacocinético (el cual está estrechamente relacionado con su eficacia).

Para tratar micosis oculares graves, en la práctica clínica se suelen preparar colirios de AmB en los servicios de farmacia hospitalaria y/o comunitaria a partir de formulaciones comercializadas para la vía parenteral, lo que implica que no esté diseñada específicamente para esta vía de administración con el agravante de que la vida útil del preparado suele ser bastante limitada (entre 6 y 72 h a temperatura ambiente). Por esta razón, el desarrollo de una formulación de AmB que reúna las características adecuadas para la vía ocular (tales como osmolaridad, tamaño de partícula, pH y esterilidad), con una mejor relación coste-eficacia, que permanezca estable durante todo el periodo de tratamiento (al menos 28 días) y sea fácil de preparar, supondría una notable mejora a la hora de tratar infecciones fúngicas oculares. Por esta razón, se han elegido las ciclodextrinas para evaluar si pueden ser el excipiente idóneo para preparar formulaciones con estas características, ya que está aprobado su uso a nivel oftálmico y además en estudios anteriores llevados a cabo por nuestro grupo de

investigación han demostrado tener un efecto sinérgico antifúngico en combinación con la AmB (Anexo I).

Tras una búsqueda exhaustiva, no se ha encontrado ninguna formulación de AmB de administración oral para tratar infecciones sistémicas, consecuencia de la baja solubilidad y permeabilidad del fármaco. Por esta razón, considero que el desarrollo de una formulación por vía oral sería un gran avance dentro de la terapia antifúngica y antileishmania, ya que evitaría los problemas relacionados con la administración parenteral del fármaco, reduciendo periodos prolongados de hospitalización y facilitando el acceso a la terapia con AmB. Trabajos previos realizados con chitosán anfifílico modificado (Quaternary Ammonium Palmitoyl Glycol Chitosan) han demostrado su potencial para mejorar la absorción oral de fármacos poco solubles [229]. En virtud de lo expuesto, se decide evaluar si su uso como excipiente pudiera ser una alternativa para mejorar la biodisponibilidad oral de la AmB ya que por un lado podría facilitar su solubilización debido a su carácter anfifílico y por otra parte, gracias a sus propiedades mucoadhesivas, podría incrementar el tiempo de contacto con la mucosa favoreciendo la permeabilidad del fármaco a través del epitelio intestinal.

## **2.2. Objetivos y planteamiento**

El objetivo global de este trabajo es desarrollar nuevas formulaciones parenterales y no parenterales (oral y ocular) de AmB que sean coste-efectivas y seguras para el tratamiento de infecciones fúngicas y parasitarias. Para alcanzar este objetivo, se han seguido las siguientes etapas:

### **1. Desarrollo y caracterización *in vitro* e *in vivo* de formulaciones parenterales de AmB poliagregada y encapsulada en microesferas de albúmina.**

Esta parte de la memoria se ha dirigido hacia la:

1. Preparación de formulaciones de AmB en forma poliagregada y su encapsulación en microesferas de albúmina para administración parenteral, así como caracterización de las mismas por medio del análisis de tamaño de partícula, morfología y toxicidad hemolítica.
2. Estudios farmacocinéticos de AmB poliagregada libre y en microesferas de albúmina en perros beagles, para evaluar el efecto de la formulación sobre la distribución del fármaco tras su administración parenteral, además de otros



factores tales como la dosis administrada, la previa administración de un anestésico y el estado de salud del beagle.

El desarrollo y los resultados de esta primera etapa se encuentran recogidos en un artículo publicado en el Int. J. Pharm (2013), 447:38-46 que lleva por título:

***Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations.***

**2. Desarrollo y caracterización *in vitro* de formulaciones no parenterales de AmB- $\gamma$ -ciclodextrina para administración ocular estables y fáciles de preparar en farmacia hospitalaria y/o comunitaria.**

Esta parte de la memoria tiene por objeto la preparación de formulaciones de AmB con  $\gamma$ -ciclodextrinas adaptadas para la administración por vía ocular y evaluación de la estabilidad del complejo formado por medio de la caracterización del estado de agregación del fármaco mediante espectrofotometría UV/Vis, tamaño de partícula y pH, así como la osmolaridad, esterilidad, valoración del contenido de AmB y actividad antifúngica *in vitro*.

El desarrollo y los resultados de esta segunda etapa se encuentran recogidos en un artículo publicado en el Int. J. Pharm (2012), 437:80-82 que lleva por título:

***A novel formulation of solubilised amphotericin B designed for ophthalmic use.***

**3. Desarrollo y caracterización *in vitro* e *in vivo* de formulaciones no parenterales de AmB-chitosán anfifílico modificado para administración oral que tengan una biodisponibilidad adecuada y una eficacia similar a las formulaciones parenterales comercializadas.**

Esta parte de la memoria se ha dirigido hacia la:

1. Obtención y caracterización del complejo formado entre AmB y chitosán anfifílico modificado (Quaternary Ammonium Palmitoyl Glycol Chitosan) utilizando técnicas instrumentales tales como espectroscopía de IR, UV/Vis, NMR, microscopía electrónica y tamaño de partícula.

2. Estudios farmacocinéticos del complejo AmB y chitosán anfifílico modificado en ratones para evaluar la biodisponibilidad oral de la AmB y la acumulación en tejidos tras la administración oral de dosis única y dosis múltiples, así como la comparación de la absorción por vía oral en perros beagles.
3. Estudios farmacodinámicos en un modelo murino de leishmaniasis visceral para evaluar la eficacia de la formulación AmB con chitosán anfifílico modificado tras la administración por vía oral y comparación de la eficacia obtenida con una formulación comercializada de AmB de administración parenteral (AmBisome®).

El desarrollo y los resultados de esta tercera etapa se encuentran recogidos en un tercer artículo pendiente de publicación que lleva por título:

***Oral particle translocation to lung, liver and spleen confers oral amphotericin B activity in visceral leishmaniasis.***

3.1.Primerapublicación:Hemolytican  
dpharmacokineticstudiesofliposomal  
andparticulate**amphotericinB**formul  
ations**AmB** **3. Publicaciones**

3.2.Segundapublicación:Anovelformu  
lationofsolubilised**amphotericinB**de  
signedforophthalmicuse3.3.Tercerap  
ublicación:Oralparticletranslocationt  
olung,liverandspleenconfersoral**amp  
hotericinB**activityinvisceralleishman  
iasis3.1.Primerapublicación:Hemolyti  
candpharmacokineticstudiesofliposo  
malandparticulate**amphotericinB**for  
mulations3.2.Segundapublicación:An  
ovelformulationofsolubilised**amphot  
ericinB**designedforophthalmicuse3.3  
.Terceranpublicación:Oralnarticletrans



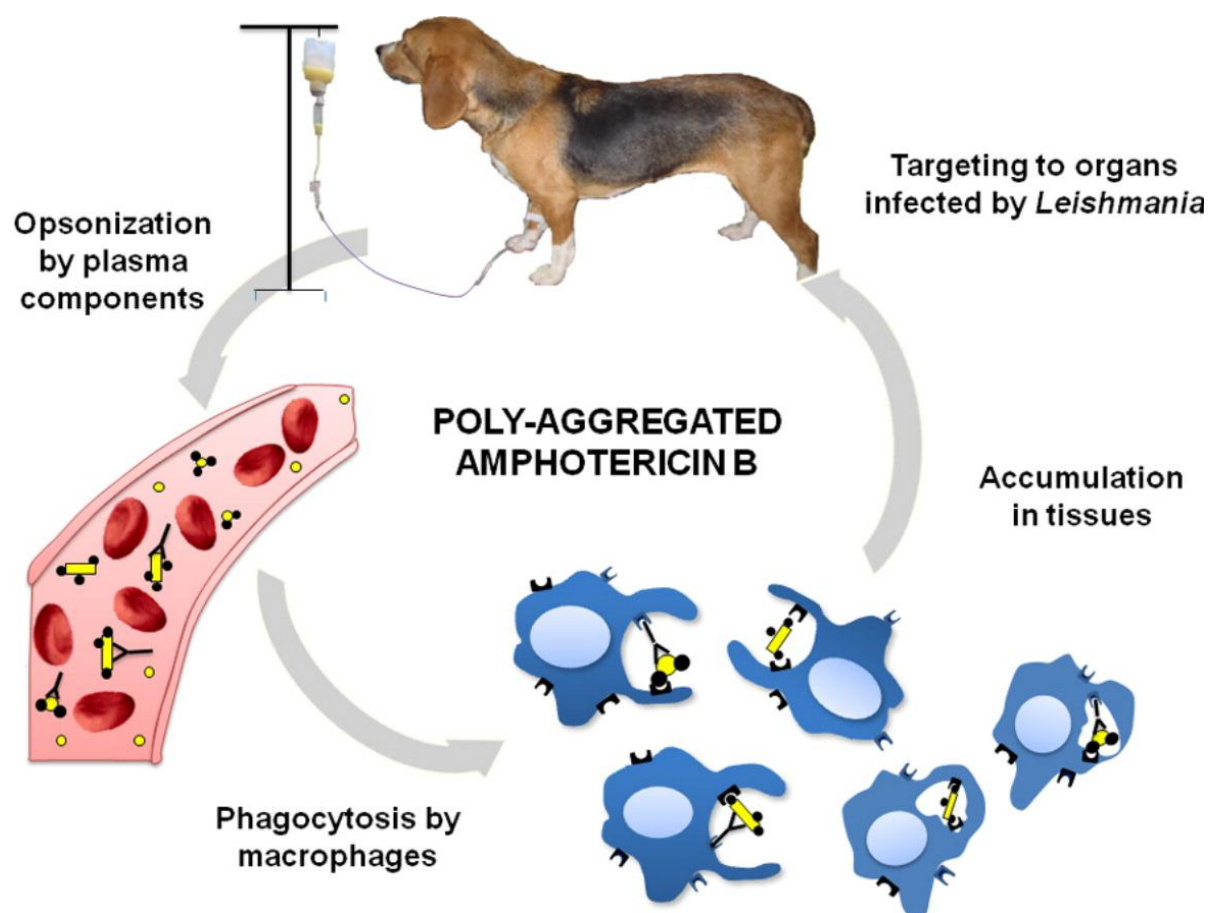
### **3. PUBLICACIONES**

#### **3.1. Primera publicación**

*Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations*

**International Journal of Pharmaceutics 447 (2013) 38– 46**

## Graphical abstract





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijpharm](http://www.elsevier.com/locate/ijpharm)

## Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations

Dolores R. Serrano<sup>a</sup>, Leticia Hernández<sup>b</sup>, Laura Fleire<sup>a</sup>, Iban González-Alvarez<sup>c</sup>, Ana Montoya<sup>b</sup>,  
María P. Ballesteros<sup>a</sup>, María A. Dea-Ayuela<sup>c,d</sup>, Guadalupe Miró<sup>b</sup>, Francisco Bolás-Fernández<sup>d</sup>,  
Juan J. Torrado<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramon y Cajal, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Cardenal Herrera-CEU, Moncada, 46113 Valencia, Spain

<sup>d</sup> Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Plaza Ramon y Cajal, 28040 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 January 2013

Received in revised form 13 February 2013

Accepted 14 February 2013

Available online 21 February 2013

#### Keywords:

Amphotericin B

Pharmacokinetics

Hemolysis

Aggregation state

Albumin microparticles

Passive targeting

### ABSTRACT

Amphotericin B (AmB) is a very effective antifungal and antiparasitic drug with a narrow therapeutic window. To improve its efficacy/toxicity balance, new controlled release formulations have been developed based on different encapsulation systems, aggregation states and particle sizes modifications. The kinetics of the hemolytic process was studied not only to characterize the toxicity of different formulations but also as an indicator of drug release. Pharmacokinetic studies in beagle dogs were carried out with those formulations that exhibited the least hemolytic toxicity: liposomal formulation (AmBisome®), poly-aggregated AmB and encapsulated particulate AmB formulation. A novel poly-aggregated AmB formulation proved to be comparable in terms of low hemolytic activity with the marketed gold standard formulation: AmBisome®. Its pharmacokinetic profile, characterized by a smaller area under the curve and larger volume of distribution, was markedly different from AmBisome®, resulting in a cost-effective alternative for the treatment of leishmaniasis which can enhance the AmB passive target by the uptake by the cells of the reticulo-endothelial system. Effects of different variables such as type of formulation, dose, microencapsulation, anesthesia and dog's healthy state on AmB pharmacokinetics were studied.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

AmB is a potent antifungal and antiparasitic drug acting by binding preferentially and selectively to ergosterol present in fungal and bacterial membranes compared to cholesterol localized in mammal

membranes and by disrupting them. The molecular interaction of AmB with the natural components of the membranes and the role of different proteins and lipids in this action is complex and has important consequences in its activity and toxicity (Brajtburg and Bolard, 1996; Cheron et al., 2003; Hartsel et al., 2001; Torrado et al., 2008). After AmB formulations intravenous administration, interaction of AmB with RBCs causes their lysis leading to anaemia. Thus, safety of novel AmB delivery strategies such as micelles, microspheres, microemulsions, liposomes, nanoparticles and others can be studied by comparing their hemolysis potential. However, hemolysis assays used by various research groups vary significantly (see Table 1 in supplementary data). Additionally using human to animal origin blood leads to differences, as human red blood cells are more resistant compared to rat making it difficult to compare the safety of novel formulations (Fukui et al., 2003; Knopik-Skrocka et al., 2003). Additionally, studying the hemolysis over various time points is more meaningful when controlled release formulations are under investigation as release from various formulations differs over time and this is not accounted if only one time point is studied (Adams et al., 2003; Adams and Kwon, 2003). These studies are vital to predict the safety of the in vitro formulations that can progress to preclinical studies. Furthermore, due to the low solubility of AmB

**Abbreviations:** AmB, Amphotericin B; RBCs, red blood cells; RES, reticulo-endothelial system; FD, non-microencapsulated free dimeric AmB formulation; F, Fungizone®; HF, heated-Fungizone; MD, microencapsulated dimer AmB; FP, non-microencapsulated free poly-aggregated AmB formulation; MP, microencapsulated poly-aggregated AmB; DLS, dynamic light scattering; TEM, transmission electron microscopy; SEM, scanning electron microscopy; PBS, phosphate buffer solution; Abs, absorbance;  $K_d$ , degradation constant; R, correlation coefficient; NNN medium, Novy-MacNeal-Nicolle medium; AUC, area under the plasma concentration versus time curve; AUMC, area under the first moment curve;  $C_{max}$ , concentration at time zero;  $\lambda$ , terminal phase elimination rate constant;  $t_{1/2}$ , terminal elimination half-life; Cl, body clearance;  $V_{ss}$ , volume of distribution at steady state;  $V_{area}$ , volume of distribution or volume area; MRT, mean residence time;  $t_s$ , mean residence time in systemic circulation;  $t_p$ , mean residence time in peripheral tissues.

\* Corresponding author at: Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Plaza Ramón y Cajal S/N, 28040, Madrid, Spain. Tel.: +34 913941620; fax: +34 913941736.

E-mail address: [torrado1@farm.ucm.es](mailto:torrado1@farm.ucm.es) (J.J. Torrado).

0378-5173/\$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.038>



it is not easy to characterize these delivery systems by conventional drug release tests. For this reason, one of the aims in this work is to propose the hemolysis studies at different times as an *ex vivo* tool to characterize not only the hemolytic toxicity but also the drug release. We have compared the hemolysis of novel AmB formulations to reference formulations such as Fungizone® and the liposomal formulation AmBisome®. The effect on hemolysis of microencapsulation, aggregation state, particle size and human RBCs concentration has also been explored.

Another parameter that is critical for intravenous formulations is their biodistribution. When particles are administered intravenously, they are quickly coated by the components of the circulation (Davis, 1997). This process renders the injected particles easily recognizable by the RES and the macrophages cells of the liver, spleen, lung and circulating macrophages will remove the opsonised drug from the circulation by phagocytosis (Blunk, 1996). Surface hydrophobicity of particles is directly correlated to the kinetics of plasma clearance by the RES (Berry, 2003). On the other hand, smaller particle size avoids RES elimination and allows for a longer circulation plasma half-life (Gref et al., 1994). The aggregation state, particle size and surface properties can be modified to target AmB to the tissues of interest and to enhance its activity while minimising its toxicity and increasing its therapeutic window (Espada et al., 2008a). In infective diseases such as leishmaniasis, the parasites are accumulated preferentially in the macrophages which are not easily accessible to AmB. In our case, we have developed a novel poly-aggregated formulation that can be used as a cost-effective alternative for the treatment of leishmaniasis which can enhance the AmB passive target by the uptake by the cells of the RES. In this work, we have studied its pharmacokinetic profile after intravenous administration and compared it to commercially available and albumin microparticulate formulations in order to explore the effect of formulation, dose administered, anesthesia and disease state on AmB pharmacokinetics.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation of AmB experimental formulations

AmB formulations were prepared as it is described by Espada et al. (Espada et al., 2008b). Free-Dimeric AmB formulation (FD) at 5 mg/ml was prepared as a colloidal dispersion similar to the marketed reference formulation Fungizone®. Briefly, 50 mg of AmB (supplied by Azelis, Spain) was dispersed in 5 ml of an aqueous solution formed by 41 mg of sodium deoxycholate (Fluka Chemie A.G., Buchs, Switzerland), 10 mg of dibasic sodium phosphate and 0.9 mg of monobasic sodium phosphate (Panreac S.A., Barcelona, Spain) previously adjusted to pH 12.0 with 2 N sodium hydroxide (Panreac S.A., Barcelona, Spain). Once the drug was homogeneously dispersed, it was acidified to pH 7.4 adding 2 N orthophosphoric acid (Panreac S.A., Barcelona, Spain). Water was added to the resulting mixture up to a final concentration of 5 mg/ml.

Free-Poly-aggregated AmB formulation (FP) was prepared as a suspension at 5 mg/ml. FP was prepared similarly to FD, but without adjusting the initial pH to 12. FP (FP cycle 0) was also centrifuged for six cycles (Hettich Universal 32 centrifuge). The five initial cycles were of 5 min at 700 × g and the last one was of 5 min at 4500 × g. FP cycle 2, 4 and 6 formulations were obtained from the supernatants collected after the 2nd, 4th, and 6th cycle.

Heated-Fungizone (HF) was obtained after heating Fungizone® (Bristol Myers Squibb, Madrid, Spain) for 1 h at 70 °C. AmBisome® was purchased from Gilead Sciences S.L., Madrid, Spain.

MP (microencapsulated poly-aggregated AmB) and MD (microencapsulated dimer AmB) were prepared from FP or FD respectively as it is described by Sanchez-Brunete et al. (2004).

Briefly, each formulation (10 ml) was mixed with 4.49 ml of a 20% serum albumin solution (Instituto Grifols SA, Barcelona, Spain) under moderate stirring. The final mixture was spray-dried (inlet temperature, 125 °C; feed rate, 2.5 ml/min; 100% aspiration) using a Büchi B 191 (Flawil, Switzerland).

### 2.2. Determination of aggregation state and particle size

Formulations were reconstituted, if required, and diluted as necessary with deionized water. The resulting dilutions were scanned between 300–450 nm (Shimadzu UV-1700 spectrophotometer) as it is described by Sanchez-Brunete et al. (2004). Particle size was assayed by DLS with a Zetatract Ultra (Microtrac Inc, USA). Mean size (nm) was determined based on size distribution in number. Five runs of 60 s per sample were carried out. Particle size of the microspheres was assayed by laser diffraction (Microtrac S3500, Microtrac Inc, USA) in the same conditions.

### 2.3. Electron microscopy characterization

The morphological examination of the formulations used for the pharmacokinetic studies (FP, MP and AmBisome®) was studied by electron microscopy. AmBisome® and FP were characterized by TEM (JEM 1010 JEOL) at an accelerating voltage of 80 kV. One drop of the unfiltered AmBisome® and FP formulations diluted to 1 mg/ml with distilled water was placed on Formvar®/Carbon Coated Grid (F196/100 3.05 mm, Mesh 300). Excess sample was filtered off with cellulose filter paper and negatively stained with 2% aqueous uranyl acetate for 20 s with excess filtered off as before. MP were characterized by SEM (JEOL JSM 6335F) at an accelerating voltage of 5.0 kV. A thin film of Au was sputtered onto the substrate prior to imaging.

### 2.4. Hemolysis test from human erythrocytes (RBCs)

Venous blood obtained from a healthy volunteer was treated by apheresis and RBCs stored at 6 ± 2 °C (Bloodbank of the Spanish Army Hospital Gomez Ulla, Madrid). Whole blood was centrifuged (10 min at 1,600 × g) and the supernatant and buffy coat were pipetted off and discarded. RBCs were then washed twice with isotonic PBS of pH 7.4 and were finely dispersed in PBS at different cell densities of 10<sup>8</sup>, 2 × 10<sup>8</sup>, 5 × 10<sup>9</sup>, 7 × 10<sup>9</sup> and 10<sup>10</sup> cells/ml. Subsequently, 2 ml of the RBCs suspension were mixed with 2 ml of buffer containing several AmB formulations in triplicate. The final AmB concentration was 200 µg/ml in all formulations except for those obtained from centrifugation of FP with 300 µg/ml. Each sample was then incubated at 37 °C in a shaking water bath (100 strokes/min). After 1, 4, 8 and 24 h incubation, hemolysis was stopped by reducing the temperature (0 °C) and unlyzed RBCs were removed by centrifugation (10 min at 2,900 × g). The supernatants were collected for analysis of the extent of hemolysis by reading the absorption of the hemoglobin at 575 nm. Results from triplicate experiments were expressed as a percentage of hemolysis with respect to the amount of hemoglobin released in the presence of water, which was taken as measure of complete (100%) lysis.

$$\text{Hemolysis (\%)} = \frac{100(\text{Abs}_s - \text{Abs}_b)}{\text{Abs}_1 - \text{Abs}_b} \quad (1)$$

where Abs<sub>s</sub> is the absorbance of the sample, Abs<sub>b</sub> is the average absorbance of the buffer, and Abs<sub>1</sub> is the average absorbance of the lysed samples. In our experimental conditions it was observed a loss of absorbance with time according to a first order process with a degradation constant of 0.043 h<sup>-1</sup> which was used to correct the absorbances. Differences in hemolysis were studied statistically using a *t*-Student paired test (Excel, Office 2003) and ANOVA test (Statgraphics 5.1, StatPoint Technologies USA). Significance was set at a *p* value <0.05. The possible protection effect of albumin



microencapsulation was studied by comparison of the hemolysis of the microencapsulated AmB (MD or MP) with the corresponding free form (FD or FP) and expressed as hemolysis reduction (HR). For instance, HR of the MD at 1 h was calculated as follows:

$$HR_{MD,1} = 100 \times \frac{\text{Hemolysis}_{FD,1} - \text{Hemolysis}_{MD,1}}{\text{Hemolysis}_{FD,1}} \quad (2)$$

Fungizone® was taken as reference and the hemolytic reduction obtained with the others formulations was calculated in a similar way as described above.

## 2.5. Kinetic of hemolysis

Kinetic degradation of RBCs was adjusted to a first order reaction according to the following equation:

$$L(100 - \text{hemolysis}_t) = A - K_d t \quad (3)$$

In Eq. (3), hemolysis is expressed in percentage and time ( $t$ ) in hours;  $K_d$  (expressed in  $\text{h}^{-1}$ ) is the first-order degradation constant and  $A$  is the  $Y$ -intercept. Five points corresponding to 0, 1, 4, 8 and 24 h were used for each kinetic adjustment. Linear square regression was applied using Microsoft Excel, Office 2003.

## 2.6. Animals

The first group of animals (healthy) was consisted of four male (weight between 15 to 19.4 kg) and two female (weight between 13.1 to 17 kg) healthy beagles approximately 4 years of age. The second group of animals (infected with *Leishmania* parasites) was constituted of five female (weight between 10.1 to 18.5 kg) beagles approximately 2 years of age. Dogs from the second group were intravenously infected with  $5 \times 10^7$  stationary phase promastigotes of *L. infantum* (M/CAN/ES/96/BCN150). Diagnosis of leishmaniasis infection was confirmed by indirect immunofluorescence antibody test for anti-*Leishmania*-specific immunoglobulin G antibodies, smears and cultured in NNN medium from bone marrow aspirates. One year after the infection, all the animals showed antibody titres  $\geq 1/3200$  and culture from bone marrow was positive. Animals were housed according to the standards of the committee of animal Welfare, fed daily, and allowed free access to water throughout the studies which were approved by Ethics Committee (University Cardenal Herrera-CEU, Valencia and Universidad Complutense of Madrid, Spain).

## 2.7. Pharmacokinetic studies in healthy beagles

Dogs from first group were randomly assigned to receive either FP ( $n=3$ ) or AmBisome® ( $n=3$ ) at 5 mg/kg of body weight. Prior to administration, FP was diluted with 5% glucose and physiological saline (Braun Medical S.A., Madrid, Spain) solution 0.9% (1:1:2) up to 1.25 mg/ml AmB concentration. AmBisome® was reconstituted using water for injection obtaining a 4 mg/ml AmB concentration which was further diluted using 5% glucose up to 1.25 mg/ml. Both formulations were administered by intravenous (iv) infusion (cephalic vein) over a 20-min period in a total volume of 60 ml.

## 2.8. Pharmacokinetic studies in beagles infected with *Leishmania*

Dogs from second group were randomly assigned to receive either FP ( $n=3$ ) or MP ( $n=2$ ) at 5 mg/kg of body weight. In the first part of this study, medetomidine (Domtor®, Esteve Veterinaria, Spain) was administered intravenously at 0.3–0.5 mg/kg as tranquilizer before the AmB infusion. After AmB infusion, Atipamezol (Antisedan®, Esteve Veterinaria, Spain) was used to get over the

sedation status. FP was diluted up to 1.25 mg/ml AmB concentration as described previously and MP were reconstituted using water for injection obtaining a 5 mg/ml AmB concentration which was further diluted up to 1.25 mg/ml with 5% glucose and physiological saline solution 0.9% (1:1:2). Both formulations were administered by iv infusion (cephalic vein) over a 20 min period in a total volume of 60 ml.

One year later, a second run of pharmacokinetic studies were carried out with the same beagles whose diagnosis for leishmaniasis was still positive. Dogs were randomly assigned to receive either FP at 5 mg/kg ( $n=3$ ) or 10 mg/kg ( $n=2$ ) of body weight. In this occasion, no anesthetic was administered prior to AmB infusion. AmB formulations (with a final AmB concentration of 1.25 and 2.5 mg/ml respectively) were administered by iv infusion as described previously.

## 2.9. Pharmacokinetic samples

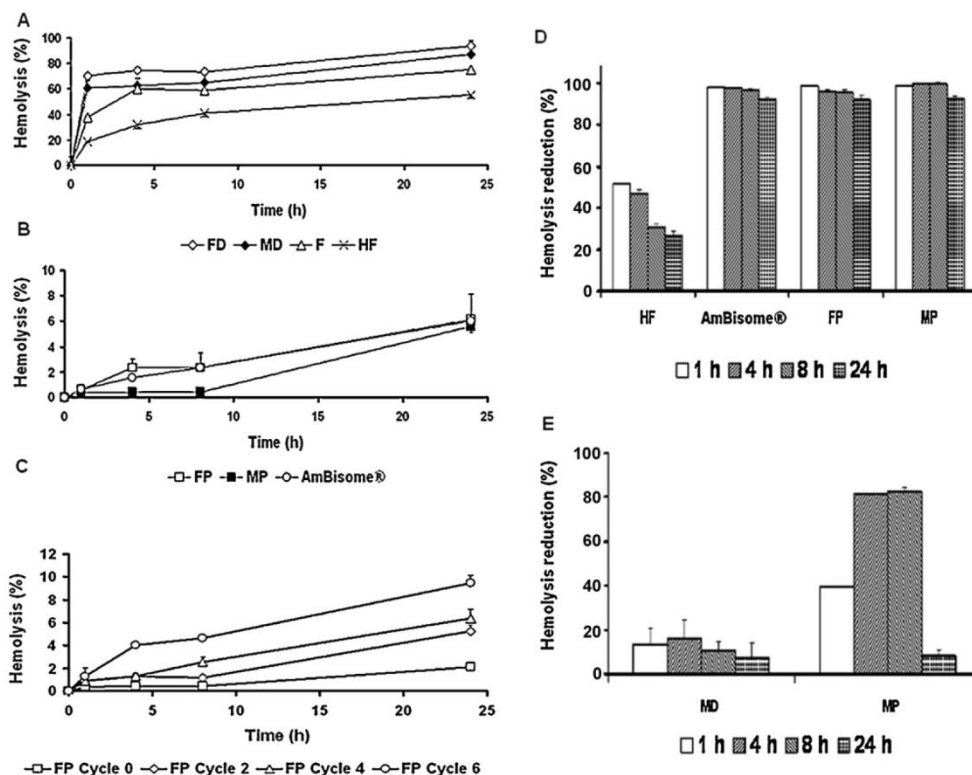
After the administration of the different AmB formulations, blood samples (2 ml) for pharmacokinetic analysis were collected in lithium/heparin tubes (Aquisel SL, Barcelona, Spain) at the following time points: time zero (predose), 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 8, 24 h from infected beagles and at 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 and 168 h from healthy beagles. Plasma was separated by centrifugation and then stored at  $-20^\circ\text{C}$  until assayed.

## 2.10. Determination of AmB plasma concentrations

Plasma samples (250  $\mu\text{l}$ ) were spiked with meloxicam (Fagrón SL, Madrid, Spain) as the internal standard (IS) at a final concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Two extractions were carried out with methanol (750  $\mu\text{l} \times 2$ ) and a third one with acetonitrile (750  $\mu\text{l}$ ). In every extraction, the mixture was vortexed and then centrifuged (9000 r.p.m., 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ). The supernatant (300  $\mu\text{l} \times 3$ ) was collected and the solvents were evaporated in a concentrator (Savant, SpeedVac®) during 6 h at  $30^\circ\text{C}$ . The samples were reconstituted with methanol:mobile phase (1:1) and then were centrifuged (9000 r.p.m., 5 min). The supernatant was analyzed by a validated HPLC method described by Espada et al. (Espada et al., 2008c). Briefly, HPLC was equipped with a Jasco PU-1580 pump, a Jasco AS-2050 Plus autosampler and a Jasco UV-1575 UV-visible detector. Integration of the peaks was performed with the program Borwin 1.5 for PC (JMBS Developments). Compounds were separated on a  $200 \times 4.6 \text{ mm}$ , 5  $\mu\text{m}$  particle size Thermo Hypersil BDS C18 reverse-phase column. Elution was carried out isocratically with a mobile phase consisted of an acetonitrile–acetic acid–water (52:4.3:43.7, v/v/v) mixture filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  hydrophilic polypropylene filter membrane (GH polypro, Pall Corp., USA). Flow rate was 1 ml/min and the effluent was monitored at 406 nm. Under these conditions, the relative retention time of AmB and IS was 5.8 and 4.9 min respectively. Plasma AmB concentrations were calculated from linear regression calibration curves of peak height ratio AmB/IS. The linear range in plasma was 0.01 to 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $R^2 > 0.9995$ ). The absolute recovery from plasma was 76.7%.

## 2.11. Pharmacokinetic data analysis

Non-compartmental pharmacokinetic analysis (Bekersky et al., 1999; Fielding et al., 1992) was used to analyse the AmB plasma concentration versus time data (see equations in pharmacokinetic data analysis in supplementary data for further details). Statistical analysis (ANOVA test) has been performed with Statgraphics® centurion XVI (version 16.1.15) considering  $p$ -values  $< 0.05$  as statistical significant difference.



**Fig. 1.** Hemolytic activity of different AmB formulations. (A) Hemolysis of highly hemolytic formulations (FD, MD, Fungizone®, HF). (B) Hemolysis of low hemolytic formulations (FP, MP, AmBisome®). (C) Hemolysis of different particle size fractions obtained by centrifugation of FP (cycle 0, 2, 4 and 6). (D) Effect on the hemolysis reduction of HF, FP, MP and AmBisome® compared to the reference formulation Fungizone®. (E) Effect on the hemolysis reduction based on the aggregation state of the microencapsulated AmB formulations compared to the free AmB formulations.

### 3. Results

#### 3.1. Physicochemical characterization of AMB formulations

The main characteristics and composition of all the tested formulations are summarized in Table 1. The AmB aggregation state is correlated to the maximum absorption spectra. AmB spectroscopic behaviour was characterized by a broad intense single band at 328–340 nm for the dimers and by smaller intensity bands at 360–363, 383–385, and 406–420 nm for the poly-aggregates as it is described by Torrado et al. (Torrado et al., 2008). The formulations that contained AmB in dimeric form exhibited a translucent appearance when they were in liquid form contrary to the opaque yellowish colour from the poly-aggregated AmB formulations. The mean recovery of the microencapsulated formulations was  $77.9 \pm 2.3\%$  and the AmB content quantified by spectrophotometry was  $3.8 \pm 0.1\%$ .

#### 3.2. Hemolysis test in RBCs

A final concentration of  $3.5 \times 10^9$  erythrocytes/ml was selected as optimal for the following experiments (see the effect of RBCs concentration on the hemolysis in supplementary data). Fig. 1 shows the hemolytic effect of different AmB formulations. Regarding the degree of hemolytic toxicity, the different tested formulations were classified as high hemolytic toxicity such as FD, MD, Fungizone® and HF (Fig. 1A) or low hemolytic toxicity as FP, MP and AmBisome® (Fig. 1B). The hemolysis reduction obtained by microencapsulation with human albumin compared to their corresponding free forms of AmB is shown in Fig. 1E. In our experimental conditions, the

protective effect of microencapsulation is dependent on the aggregation state of AmB. When AmB is poly-aggregated, microencapsulation decreases its hemolytic toxicity. The hemolysis reduction obtained with MP is maximum at 4 and 8 h and significantly ( $p < 0.05$ ) different to that obtained at 1 and 24 h. However, no differences ( $p > 0.05$ ) related to time were observed with the microencapsulation of the dimer form.

Significant ( $p < 0.01$ ) reduction of hemolysis was obtained when particle size increased by inducing aggregation either by heating (HF) or by pH control during production (FP). The hemolysis reduction of different formulations of AmB (FP, MP and AmBisome®) was compared to the hemolysis of Fungizone® (Fig. 1D). No significant ( $p > 0.05$ ) differences in the protection effect among FP, MP and AmBisome® were found.

In order to test the suitability of the hemolysis test to find possible differences on toxicity regarding the particle size of AmB, the FP formulation was centrifuged several cycles. The more the centrifugation cycles employed, the smaller the particle size of the different poly-aggregated AmB fractions obtained (Fig. 2A) and the higher the hemolytic activity (Fig. 1C). Significant ( $p < 0.05$ ) differences on hemolysis depending time of contact and particle size were found.

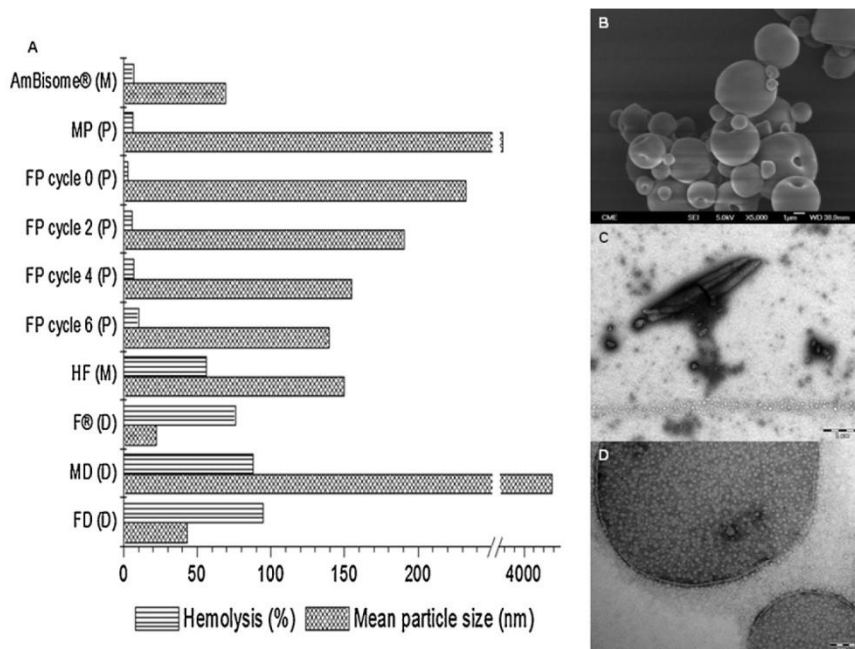
Aggregation state, particle size and hemolytic toxicity after 24 h of contact of the different formulations is shown in Fig. 2A. Quasi spherical shape with a particle size range between 1–10  $\mu\text{m}$ , non porous surface and no unloaded AmB like needle crystals were observed by SEM of MP (Fig. 2B). A heterogeneous particle size was observed in TEM of FP (Fig. 2C). Loaded spherical vesicles between 50–100 nm were mixed with nanoaggregates of small size (around 200 nm) and AmB crystals of a couple of microns. A homogeneous population of nanovesicles is observed in TEM



**Table 1**

Characteristics of AmB formulations prepared for the hemolytic toxicity studies.

AmB formulation	Abbreviation	Excipients	Ratio AmB:excipients	AmB aggregation state	Maximum absorption spectra (nm)	Appearance in liquid form
Dimeric AmB formulation	FD	Sodium deoxycholate Dibasic sodium phosphate Monobasic sodium phosphate Sodium hydroxide Orthophosphoric acid	49: 51	Dimers	328–340	Translucent yellowish - orangish
Poly-aggregated AmB formulation	FP	Sodium deoxycholate Dibasic sodium phosphate Monobasic sodium phosphate	49: 51	Poly-aggregates	360–363, 383–385, 406–420	Opaque yellowish
Microencapsulated dimer AmB	MD	20% serum albumin solution Sodium deoxycholate Dibasic sodium phosphate Monobasic sodium phosphate Sodium hydroxide Orthophosphoric acid	5: 95	Dimers	328–340	Translucent yellowish
Microencapsulated poly-aggregated AmB	MP	20% serum albumin solution Sodium deoxycholate Dibasic sodium phosphate Monobasic sodium phosphate	5: 95	Poly-aggregates	360–363, 383–385, 406–420	Opaque yellowish
Heated-Fungizone	HF	Sodium deoxycholate Dibasic sodium phosphate Monobasic sodium phosphate	49: 51	Poly-aggregates	328–340, 360–363, 383–385, 406–420	Translucent orangish
Fungizone®	F	Sodium deoxycholate Dibasic sodium phosphate Monobasic sodium phosphate	49: 51	Dimers	328–340	Translucent yellowish - orangish
AmBisome®	-	Hydrogenated soy phosphatidylcholine Cholesterol Distearoylphosphatidylglycerol (as the sodium salt) Alpha-tocopherol Sucrose Sodium succinate hexahydrate	3.8: 96.2	Dimers	328–340	Translucent yellowish



**Fig. 2.** Characterization of AmB formulations. (A) Particle size and hemolysis at 24 h of different AmB formulations at 200 µg/ml (those obtained by centrifugation of FP the concentration was 300 µg/ml). Aggregation state of AmB is in brackets (D = dimer; P = poly-aggregated; M = mixture of different states). (B) SEM imaging of MP, 5000× magnification. (C) TEM imaging of FP, 20000× magnification. (D) TEM imaging of AmBisome®, 80000× magnification.

**Table 2**

Hemolysis kinetic data of the different tested formulations at 200 or 300 µg/ml of AmB.

Formulation	Concentration (µg/mL)	R	Y-intercept (A)	$K_d$ ( $h^{-1}$ )
FD	200	−0.90	3.94	0.0921
MD	200	−0.89	4.09	0.0662
F	200	−0.85	4.25	0.0456
HF	200	−0.92	4.43	0.0291
FP	200	−0.98	4.60	0.0025
MP	200	−0.96	4.61	0.0024
AmBisome®	200	−0.99	4.60	0.0024
FP-Cycle 0	300	−0.97	4.60	0.0008
FP-Cycle 2	300	−0.97	4.60	0.0021
FP-Cycle 4	300	−0.99	4.60	0.0026
FP-Cycle 6	300	−0.97	4.59	0.0038

Key: R- Correlation coefficient; (A)-Y-intercept;  $K_d(h^{-1})$  - First-order degradation constant.

of AmBisome® (Fig. 2D). Probably, when AmBisome® was reconstituted prior to imaging, liposomes collapsed resulting in bigger particle size than that one measured by DLS.

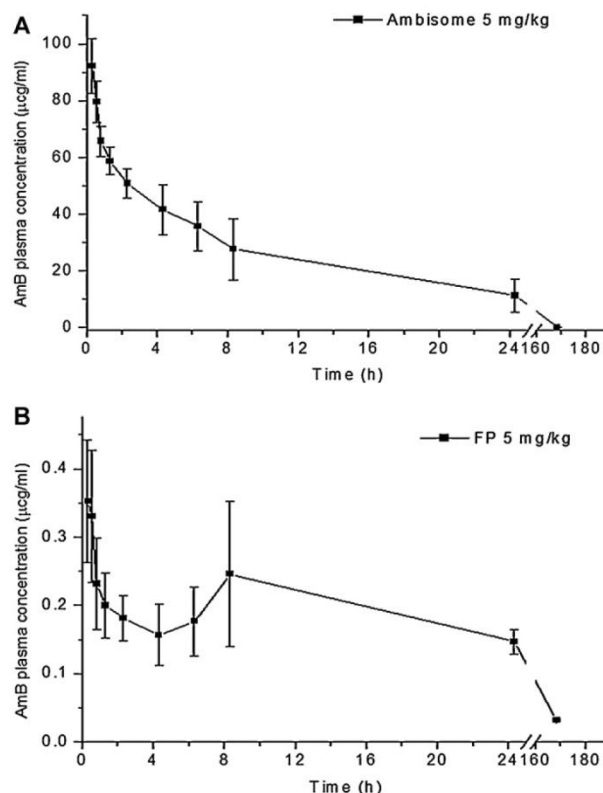
### 3.3. Kinetic of hemolysis

Hemolysis kinetics for the different tested formulations is shown in Table 2. A better adjustment to a first order degradation was obtained with the less hemolytic formulations (FP, MP and AmBisome®). No statistical significant differences ( $p < 0.05$ ) in values of degradation constant and Y-intercept were found. With increasing the number of centrifugation cycles for FP, it was obtained smaller poly-aggregated AmB fractions with higher degradation constants. Interestingly, the more hemolytic formulations exhibited not only a higher values of degradation constant but also lower values of both Y-intercept and correlation coefficient indicating that for these formulations the kinetics are different and exhibit a faster hemolysis.

### 3.4. Pharmacokinetic studies in healthy beagles

AmB concentrations in plasma following iv administration at 5 mg/kg in healthy beagles are shown in Fig. 3. AmBisome® pharmacokinetic profile (Fig. 3A) was markedly different from FP formulation (Fig. 3B). In our study, AmBisome® achieved a high plasma peak ( $C_{max}$  was 52-fold higher than FP) which is similar to other studies from literature (Azanza, 2012; Bellmann, 2007; Walsh et al., 1998). Nevertheless, FP displayed a rapid decline followed by a very slow disappearance from plasma over the next seven days. Interestingly, plasma levels were observed to have a second peak in plasma levels in many dogs after the initial decline following iv administration. That occurred generally between 4 to 8 h after drug administration.

Non-compartmental pharmacokinetic parameters for both formulations are shown in Table 3. Similar AmBisome® parameters have been previously reported by other authors (Azanza, 2012; Bekersky et al., 1999; Bellmann, 2007). However,  $C_{max}$  and AUC are slightly higher in our study possibly due to a shorter infusion time. FP displayed lower AUC, larger CI and wider volume of distribution than AmBisome® which is related to a faster clearance by opsonisation leading to an accumulation of AmB in tissues. In fact, its mean residence time in peripheral tissues was 11-fold higher and the  $t_{1/2}$  was more than 2-fold higher than AmBisome® which may be related to a slow redistribution from tissues.



**Fig. 3.** Pharmacokinetic profile of FP and AmBisome® after iv administration at 5 mg/kg in healthy beagles. (A) AmB plasma concentration-versus time after administration of AmBisome®. (B) AmB plasma concentration-versus time after administration of FP.

### 3.5. Pharmacokinetic studies in beagles infected with *Leishmania*

The effects on AmB plasma concentrations vs time ( $AUC_0^{24}$  values) of four different variables: dose (5 and 10 mg/kg), dog's healthy state (healthy or infected with *Leishmania*), anesthesia (medetomidine) and AmB microencapsulation (MP or FP) are shown in Fig. 4A. The last blood sample was obtained 24 h post-administration. Because of the AmB secondary plasma peaks, elimination rate constants and other pharmacokinetic parameters could not be reliably determined. In infected beagles, there is a significant

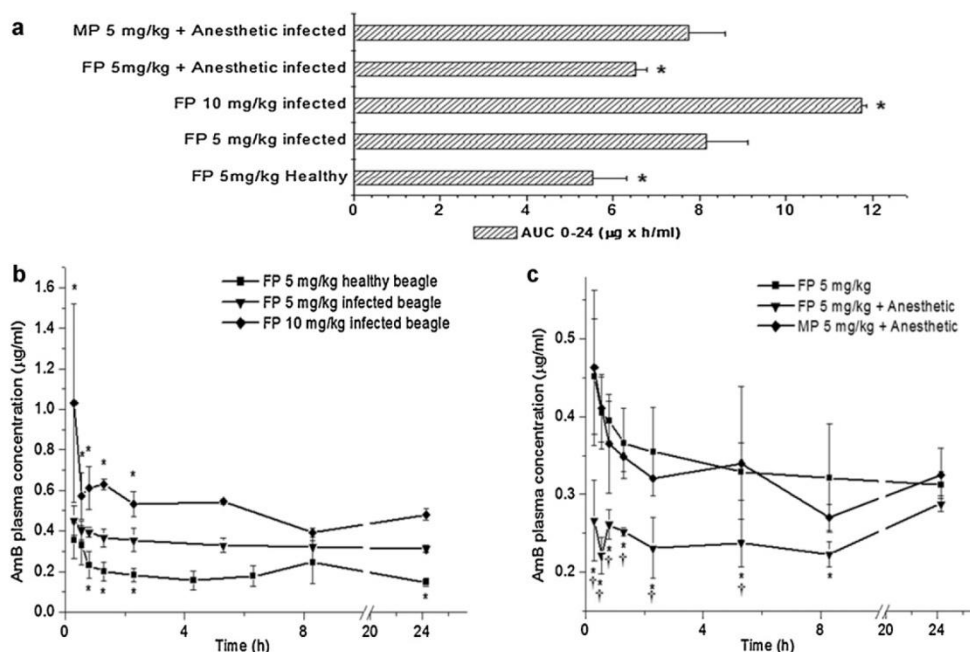
**Table 3**

Non-compartmental pharmacokinetic parameters of FP and AmBisome® calculated from iv administration at 5 mg/kg in healthy beagles.

Non compartmental pharmacokinetic parameters	FP	AmBisome®
$\lambda$ ( $h^{-1}$ )	$0.012 \pm 0.001$	$0.030 \pm 0.001^*$
$t_{1/2}$ (h)	$56.04 \pm 3.48$	$23.39 \pm 0.45^*$
$C_{max}$ (µg/ml)	$2.11 \pm 0.31$	$110.22 \pm 13.37^*$
MRT (h)	$65.50 \pm 5.67$	$19.22 \pm 0.64^*$
ts (h)	$9.79 \pm 1.12$	$14.18 \pm 2.58^*$
tp (h)	$55.71 \pm 5.97$	$5.04 \pm 2.66^*$
CI (ml/h/kg)	$245.56 \pm 18.69$	$3.25 \pm 0.17^*$
$V_{area}$ (L/kg)	$19.92 \pm 2.69$	$0.11 \pm 0.01^*$
Vss (L/kg)	$16.15 \pm 2.52$	$0.06 \pm 0.00^*$
$AUC_0^{24}$ (µg·h/ml)	$5.51 \pm 0.79$	$700.42 \pm 68.66^*$
$AUC_0^\infty$ (µg·h/ml)	$20.44 \pm 1.57$	$1539.69 \pm 82.55^*$
$AUMC_0^\infty$ (µg·h <sup>2</sup> /ml)	$1333.34 \pm 47.22$	$29602.56 \pm 2087.58^*$

\*Statistical significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to FP formulation.





**Fig. 4.** Pharmacokinetic profile of FP and MP formulations after iv administration in healthy and infected beagles. (A) AUC value comparison among different formulations (FP and MP), different doses (5 and 10 mg/kg), co-administration of acepromazine and beagle's healthy state. \*Differences ( $p < 0.05$ ) compared to FP (5 mg/kg) infected beagles group. (B) AmB plasma concentration-versus time after iv administration of FP in infected (at 5 and 10 mg/kg) and healthy beagles (at 5 mg/kg). \*Differences ( $p < 0.05$ ) compared to FP (at 5 mg/kg) in infected beagles. (C) AmB plasma concentration-versus time after iv administration at 5 mg/kg of FP, FP + Anesthetic and MP + Anesthetic. \*Differences ( $p < 0.05$ ) between FP and FP + Anesthetic groups. †Differences ( $p < 0.05$ ) between FP + Anesthetic and MP + Anesthetic groups.

( $p < 0.05$ ) 1.5 fold increase in AUC when it is administered double dose of FP formulation (10 instead of 5 mg/kg). When the same FP formulation at 5 mg/kg was administered in healthy beagles, AUC levels were significantly ( $p < 0.05$ ) lower than in the infected ones. The same relationships were observed for AmB plasma concentration (Fig. 4B). AUC values were significant ( $p < 0.05$ ) lower when anesthetic was administered prior to FP infusion at 5 mg/kg. The same effect was observed on AmB plasma concentration (Fig. 4C). With regard to the effect of albumin microparticulate carrier, AmB plasma values obtained after MP administration were significant higher ( $p < 0.05$ ) than those values from FP until 5 h post-administration (Fig. 4C).

### 3.6. Adverse reactions produced with AmB formulations

Two adverse reactions were observed during AmB administration: hypotension and bronchospasm. Hypotension was the main side effect observed in all the dogs with all the AmB formulations especially from 15 min to 1 h post-administration. This effect was extended for 4–5 h more when the anesthetic was dosed probably because of the synergistic hypotensor effect between AmB and medetomidine.

Bronchospasm is reported as a rare but severe reaction that can occur with the infusion of AmB. In the end of the infusion time, one dog from the AmBisome® group and another from the MP group showed symptoms of bronchospasm. After 10 min, the respiratory function was returned to normal without being required any further medical attention.

## 4. Discussion

It is well known that aggregation and particle size have a key role on toxic and chemotherapeutic effects of drugs. As it has been

reported previously, aggregation of AmB decreases the hemolytic activity of AmB (Espada et al., 2008b) (Mohamed-Ahmed et al., 2012). In 1963 Bennet et al. (Bennett et al., 1963) correlated particle size of intravenous AmB with toxic and chemotherapeutic effects. In these early experiments in dog, mouse and man, it was demonstrated that progressive increases in the particle size of intravenously injected AmB were directly related to decreased drug toxicity. Etten et al. (van Etten et al., 2000) described how the mild heating of Fungizone® increased the AmB particle size resulting in a less hemolytic activity than the marketed formulation. Aggregation leads to bigger particles with smaller specific surface area, therefore, lower hemolytic toxicity.

The hemolysis reduction obtained by microencapsulation with albumin is related to the time of contact, being the maximum protection effect between 4 and 8 h. These differences may be due to the release characteristics of the albumin microspheres which are described as hydrophilic particles easy to disperse in aqueous media with a high burst effect (Gupta and Hung, 1989a,b). This effect may be responsible for the lower protection effect observed at the initial sampling time (1 h) compared to later times (4 and 8 h). Albumin microspheres are hydrophilic carriers which generally release its cargo much faster than other hydrophobic particles. Thus, most of the poly-aggregated AmB would have been released during 24 h; therefore, lower protection effect on hemolysis would be expected at this time. Albumin microspheres containing small dimer AmB particles were not able either to control the release or decrease the hemolytic toxicity. Probably, the smaller and more hemolytic dimer AmB particles are released faster than bigger poly-aggregated AmB particles.

Pharmacokinetic studies were carried out with the three least hemolytic formulations (FP, MP and AmBisome®). Pharmacokinetic behaviour of FP seems to be more similar to Abelcet® (AmB marketed lipid complex formulation) than AmBisome® (liposomal



formulation) Abelcet® also exhibits a large  $V_d$ ,  $Cl$ ,  $t_{1/2}$  and low  $C_{max}$  and AUC. This correlation may be based on similar particle size between the biggest FP fraction and the ribbon-like structures of Abelcet® close to 3  $\mu m$  (Vanneaux, 2007). Moreover, the second AmB plasma peaks found with FP have been also observed after iv administration of Abelcet® by other authors as Fielding et al. (Fielding et al., 1992). It seems to be related to several mechanisms. On the one hand, plasma level fluctuations could be the result of a cyclic input of the drug into the circulation either by excretion in bile followed by enterohepatic circulation or redistribution from other tissues such as the liver which secretes lipoproteins which could contain bound AmB. On the other hand, it could be related to diurnal and/or postprandial increment in circulating lipids which could trigger a rise in the binding capacity of AmB to lipoproteins and sterols in plasma (Fielding et al., 1992).

Similarly, FP formulation is made up of poly-aggregates with bigger particle size than AmBisome®. Bigger particles are cleared faster from the circulation by the RES (Gref et al., 1994). AmB liposomes (AmBisome®) have a mean particle size of 68 nm which is small enough for being less opsonised by plasma components (Berry, 2003), but at the same time, they are big enough for not being rapidly cleared by the kidney (taking into account that the glomerular filtration apparatus possesses an effective size cutoff of 10 nm (Choi et al., 2011)). Pharmacokinetic profile of AmBisome® is described as non-linear and administration of high doses (such as 5 mg/kg) has been attributed to a saturable uptake by RES (Walsh et al., 1998) which prolongs its systemic circulation. However, *Leishmania* is a parasite that accumulates in the organs of the RES. Thus, passive targeting is more useful to target AmB towards its site of action.

Poly-aggregates act as an AmB release system from the bigger aggregates and at the same time render the formulation easily recognizable by macrophages. On the one hand, when double the dose was administered (10 mg/kg), AUC increased only 1.5 fold, which is not proportional to the increment in dose. This may be related to a faster plasma clearance by the RES but also to saturation of plasma protein binding (Bryson, 1996). On the other hand, after FP administration, AmB plasma levels and AUC were significantly lower in healthy beagles than in the infected ones. Taking into account that the in vitro phagocytic activity of the macrophages infected by *Leishmania* is diminished (Olivier and Tanner, 1987), the uptake of opsonised particles from the circulation will be lower which can explain why AmB plasma concentration is higher in infected beagles compare to the healthy ones. This could be also explained either by an increased AmB elimination from the inflamed tissues or by an eagerly binding of the AmB to the ergosterol present in the membrane of the parasites which are in the systemic circulation (Gershkovich et al., 2010).

Regarding the effect of the anesthetic, AmB plasma values were lower when medetomidine was administered prior to FP formulation. Medetomidine is an anesthetic with an extensive plasma protein binding (92–95%) (Salonen, 1989), but also AmB is extensively protein bound (95–99%) (Bellmann, 2007). Therefore, the lower AmB plasma levels found in the presence of anesthetic are probably related to a binding displacement drug interaction. Taking into account its narrow therapeutic window, in the clinical practice, AmB should not be co-administered with other drugs that bind extensively to plasmatic proteins.

Opposite effect was observed when AmB was administered with an albumin microparticulate carrier (MP). Albumin remains in the systemic circulation after iv administration. Because of the avid binding capacity of the drug, albumin prolongs AmB systemic circulation, which may be potential useful for the treatment of systemic fungal infections. MP have shown to be a good carrier for AmB (due to the low hemolytic toxicity). However, the bronchospasm caused

after iv administration may be related with an allergic reaction to the human albumin used in the synthesis of the MP and then, albumin should be substituted by species-specific albumin to avoid any risk of allergic reactions.

FP takes several advantages of the other AmB formulations. Firstly, it was the only formulation that did not cause any severe side effect as bronchospasm in any of the dogs. Secondly, the administration of high doses (10 mg/kg) was well tolerated by the beagles without giving way to high plasma levels. This plays a key role considering that phagocytic activity of the macrophages is diminished by *Leishmania* infection (Walsh et al., 1998). Then, higher and well-tolerable doses of AmB may be required to obtain the same accumulation in tissues and therefore, the same efficacy.

In conclusion, aggregation state, particle size and encapsulation play a critical role regarding AmB pharmacokinetics and toxicity. Before carrying out pharmacokinetic studies, hemolysis test is an useful tool to characterize not only the toxicity but also the drug release. A novel poly-aggregated AmB formulation could be a cost-effective alternative for leishmaniasis treatment in dogs because it has proved to be comparable in terms of low hemolytic activity with the marketed gold standard formulation: AmBisome®. Moreover, it displayed a better pharmacokinetic profile to target AmB towards infected macrophages.

#### Acknowledgements

This work was supported by Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) grant (AGL2007-64120/GAN), and a grant from the Complutense University and Madrid Community Administration to the research group 910939. D.R. Serrano is supported by a Research Fellowship FPU grant (AP2008-00235) from the Spanish Ministry of Education. Thanks are due to the analytical assistance of the "CAI de Microscopía Electrónica Luis Bru Universidad Complutense de Madrid (UCM)" and the help of Bloodbank of the Spanish Army Gomez Ulla Hospital from Madrid.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.038>.

#### References

- Adams, M.L., Andes, D.R., Kwon, G.S., 2003. Amphotericin B encapsulated in micelles based on poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) derivatives exerts reduced in vitro hemolysis but maintains potent in vivo antifungal activity. *Biomacromolecules* 4, 750–757.
- Adams, M.L., Kwon, G.S., 2003. Relative aggregation state and hemolytic activity of amphotericin B encapsulated by poly(ethylene oxide)-block-poly(N-hexyl-L-aspartamide)-acyl conjugate micelles: effects of acyl chain length. *J. Control. Release* 87, 23–32.
- Azanza, J.R., Barberán, J., 2012. Liposomal amphotericin B: a unique pharmacokinetic profile. An unfinished story. *Rev. Esp. Quimioter* 25, 17–24.
- Bekersky, I., Boswell, G.W., Hiles, R., Fielding, R.M., Buell, D., Walsh, T.J., 1999. Safety and toxicokinetics of intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome) in beagle dogs. *Pharm. Res.* 16, 1694–1701.
- Bellmann, R., 2007. Clinical pharmacokinetics of systemically administered antimycotics. *Curr. Clin. Pharmacol.* 2, 37–58.
- Bennett, J.E., Hill 2nd, G.J., Butler, W.T., Emmons, C.W., 1963. Correlation of particle size of intravenous amphotericin B with toxic and chemotherapeutic effects. *Antimicrob. Agents Chemother.* (Bethesda) 161, 745–752.
- Berry, C.C., Curtis, A.S.G., 2003. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36, 198–206.
- Blunk, T., Luck, M., Calvor, A., Hochstrasser, D.F., Sanchez, J.C., Muller, B.W., Muller, R.H., 1996. Kinetics of plasma protein adsorption on model particles for controlled drug delivery and drug targeting. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 42, 262–268.
- Brajtburg, J., Bolard, J., 1996. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 512–531.
- Bryson, P.D., 1996. Pharmacokinetics and toxicokinetics. In: *Comprehensive Reviews in Toxicology: for Emergency Clinicians*, 3rd ed. Taylor & Francis Publishers, Washington DC (USA), pp. 61–74.

- Cheron, M., Petit, C., Bolard, J., Gaboriau, F., 2003. Heat-induced reformulation of amphotericin B-deoxycholate favours drug uptake by the macrophage-like cell line J774. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 904–910.
- Choi, C.H., Zuckerman, J.E., Webster, P., Davis, M.E., 2011. Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 6656–6661.
- Davis, S.S., 1997. Biomedical applications of nanotechnology—implications for drug targeting and gene therapy. *Trends Biotechnol.* 15, 217–224.
- Espada, R., Valdespina, S., Dea, M.A., Molero, G., Ballesteros, M.P., Bolas, F., Torrado, J.J., 2008a. In vivo distribution and therapeutic efficacy of a novel amphotericin B poly-aggregated formulation. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 1125–1131.
- Espada, R., Valdespina, S., Alfonso, C., Rivas, G., Ballesteros, M.P., Torrado, J.J., 2008b. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *Int. J. Pharm.* 361, 64–69.
- Espada, R., Josa, J.M., Valdespina, S., Dea, M.A., Ballesteros, M.P., Alunda, J.M., Torrado, J.J., 2008c. HPLC assay for determination of amphotericin B in biological samples. *Biomed. Chromatogr.* 22, 402–407.
- Fielding, R.M., Singer, A.W., Wang, L.H., Babbar, S., Guo, L.S., 1992. Relationship of pharmacokinetics and drug distribution in tissue to increased safety of amphotericin B colloidal dispersion in dogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 299–307.
- Fukui, H., Koike, T., Saheki, A., Sonoke, S., Tomii, Y., Seki, J., 2003. Evaluation of the efficacy and toxicity of amphotericin B incorporated in lipid nano-sphere (LNS). *Int. J. Pharm.* 263, 51–60.
- Gershkovich, P., Wasan, E.K., Sivak, O., Li, R., Zhu, X., Werbovetz, K.A., Tidwell, R.R., Clement, J.G., Thornton, S.J., Wasan, K.M., 2010. Visceral leishmaniasis affects liver and spleen concentrations of amphotericin B following administration to mice. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 535–537.
- Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M.T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., Langer, R., 1994. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 263, 1600–1603.
- Gupta, P.K., Hung, C.T., 1989a. Albumin microspheres. I: Physico-chemical characteristics. *J. Microencapsul.* 6, 427–462.
- Gupta, P.K., Hung, C.T., 1989b. Albumin microspheres. II: Applications in drug delivery. *J. Microencapsul.* 6, 463–472.
- Hartsel, S.C., Baas, B., Bauer, E., Foree Jr., L.T., Kindt, K., Preis, H., Scott, A., Kwong, E.H., Ramaswamy, M., Wasan, K.M., 2001. Heat-induced superaggregation of amphotericin B modifies its interaction with serum proteins and lipoproteins and stimulation of TNF-alpha. *J. Pharm. Sci.* 90, 124–133.
- Knopik-Skrocka, A., Bielawski, J., Glab, M., Klafaczynska, A., Wulkiewicz, M., 2003. A kinetics study of pig erythrocyte hemolysis induced by polyene antibiotics. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8, 439–454.
- Mohamed-Ahmed, A.H., Les, K.A., Seifert, K., Croft, S.L., Brocchini, S., 2012. Non-covalent complexation of amphotericin-B with poly(alpha-glutamic acid). *Mol. Pharm.* (Epub ahead of print).
- Olivier, M., Tanner, C.E., 1987. Susceptibilities of macrophage populations to infection in vitro by *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.* 55, 467–471.
- Salonen, J.S., 1989. Pharmacokinetics of medetomidine. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 85, 49–54.
- Sanchez-Brunete, J.A., Dea, M.A., Rama, S., Bolas, F., Alunda, J.M., Raposo, R., Mendez, M.T., Torrado-Santiago, S., Torrado, J.J., 2004. Treatment of experimental visceral leishmaniasis with amphotericin B in stable albumin microspheres. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3246–3252.
- Torrado, J.J., Espada, R., Ballesteros, M.P., Torrado-Santiago, S., 2008. Amphotericin B formulations and drug targeting. *J. Pharm. Sci.* 97, 2405–2425.
- van Etten, E.W., van Vianen, W., Roovers, P., Frederik, P., 2000. Mild heating of amphotericin B-desoxycholate: effects on ultrastructure, in vitro activity and toxicity, and therapeutic efficacy in severe candidiasis in leukopenic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1598–1603.
- Vanneaux, V., Proust, V., Chéron, M., Besnard, M., Corriol, O., Gimenez, F., Singlas, E., Legrand, P., 2007. A physical and chemical stability study of amphotericin B lipid complexes (Abelcet) after dilution in dextrose 5%. *The European Journal of Hospital Pharmacy Science* 13, 10–13.
- Walsh, T.J., Yeldandi, V., McEvoy, M., Gonzalez, C., Chanock, S., Freifeld, A., Seibel, N.I., Whitcomb, P.O., Jarosinski, P., Boswell, G., Bekersky, I., Alak, A., Buell, D., Barrett, J., Wilson, W., 1998. Safety, tolerance, and pharmacokinetics of a small unilamellar liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in neutropenic patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2391–2398.

---

**SUPPLEMENTARY DATA*****Pharmacokinetic data analysis***

The area under the plasma concentration versus time curve (AUC) and the area under the first moment curve (AUMC) from 0-24 h were calculated using the linear trapezoidal method. The concentration at time=0 ( $C_{\max}$ ) was calculated by extrapolation on the y-axis of the ln concentration (the first two plasma concentration points) versus time. The terminal phase elimination rate constant ( $\lambda$ ) was calculated from the negative slope of ln-linear terminal portion of the plasma concentration versus time curve. The terminal elimination half-life ( $t_{1/2}$ ) was calculated as  $0.693/\lambda$ . In the pharmacokinetic studies in healthy beagles, the AUC and AUMC were extrapolated from last time point (168 h) to infinity being calculated as  $C_{168h}/\lambda$  and  $[(C_{168h} \times 168)/\lambda + C_{168h}/\lambda^2]$ , respectively. Total body clearance ( $Cl = \text{Dose}/AUC_{0-\infty}$ ), volume of distribution at steady state [ $V_{ss} = Cl \times (AUMC_{0-\infty}/AUC_{0-\infty})$ ], volume of distribution or volume area [ $V_{\text{area}} = \text{Dose} / (\lambda \times AUC_{0-\infty})$ ], mean residence time ( $MRT = AUMC_{0-\infty}/AUC_{0-\infty}$ ), mean residence time in systemic circulation ( $t_s = AUC_{0-\infty}/C_0$ ), mean residence time in peripheral tissues ( $t_p = MRT - t_s$ ) were calculated using these equations.

***Effect of RBCs concentration on the hemolysis***

For so low soluble drugs such as AmB it is not easy to perform conventional drug release tests. For this reason an *ex vivo* test suitable to study the drug release characteristics of the different AmB formulations is interesting in the development of new formulations and for quality control purposes. Although hemolysis studies have been performed since long time ago to study and compare the toxicity of different AmB formulations [27, 283] only recently it have been proposed to study sustained release characteristics of new AmB formulations [190, 284]. However, there are several variables in the hemolysis test that should be study previously in order to use it as a drug release test. Table 1 shows the variability of the experimental conditions of the hemolysis test reported by different authors. In order to standardize the hemolysis test it is important first to select the type of RBCs. Probably human RBCs could be the easier to obtain and the most relevant in terms of extrapolation to clinical practice. Apheresis extraction technique of RBCs allowed us to obtain enough cells of the same volunteer to perform all the experiments reported in this work. Furthermore, uniformity of cells is guaranteed by this procedure. A second point is the concentration of RBCs. Figures 1.A.



and 1.B. show in a semi-logarithmic scale the effect of RBCs concentration on the hemolysis of FP and MP formulations respectively. For both formulations it is clear that the concentration of RBCs has a significant (ANOVA,  $P < 0.05$ ) effect on the hemolysis. At higher RBCs concentrations there is less toxicity probably because there is less membrane surface of the RBCs exposed to the action of AmB. The protection effect of microencapsulation is evident in figure 1 (ANOVA,  $P < 0.05$ ).

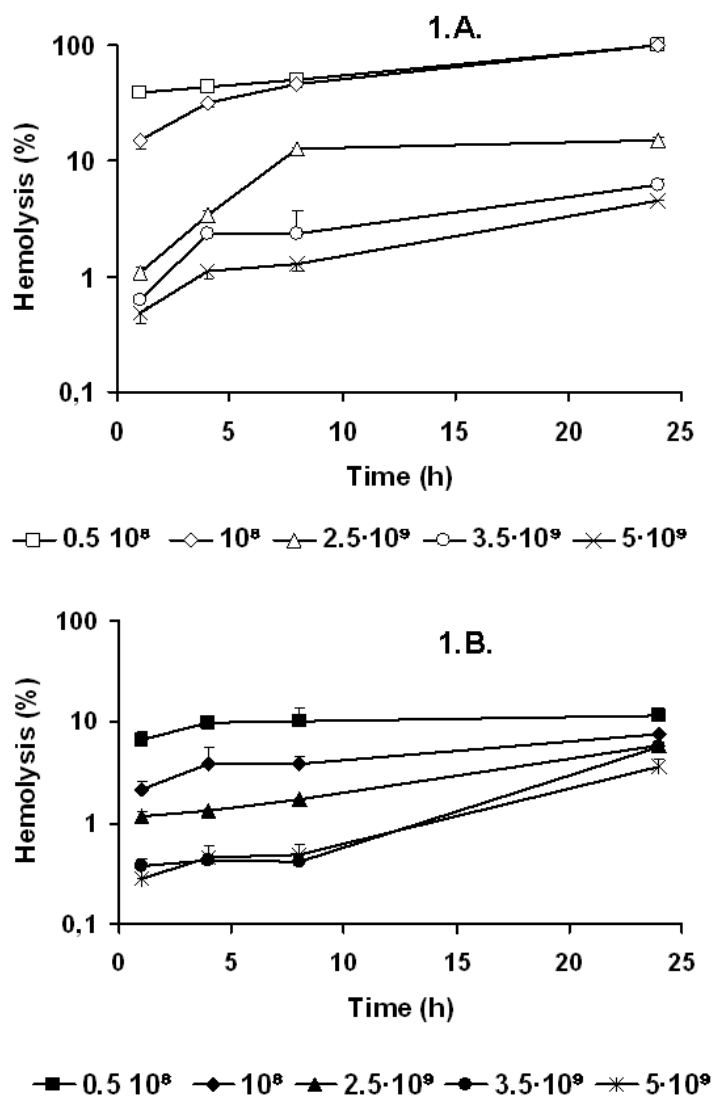


Figure 1. Effect of RBCs concentration on the hemolysis produced by poly-aggregated AmB formulation (FP) (Figure 1.A.) and microencapsulated poly-aggregated AmB (MP) (Figure 1.B.) at 1, 4, 8 and 24 hours.

**Table 1. Summary of some hemolysis test conditions reported recently in literature.**

Erythrocyte source	Erythrocyte concentration	Time of contact	AmB system tested	Reference
Rat	2 %	6 h	Fungizone <sup>®</sup> heated-Fungizone <sup>®</sup> and derivatives	(van Etten et al., 2000)
Human	8-9 x 10 <sup>7</sup> cells/mL	1 h	Cochleates	(Zarif et al., 2000)
Human	Diluted	30 min	Micelles	(Lavasanifar et al., 2002)
Bovine	7.4 x 10 <sup>7</sup> cells/mL	1, 9, 10 and 24 h	Micelles and free AmB	(Adams et al., 20003; Adams and Kwon, 2003)
Mice	0.1%	1 h	Liposomes	(Chakraborty and Naik, 2003)
Human	2% hematocrit (~ 2 x 10 <sup>8</sup> cells/mL)	30 min	Lipid complexes and Fungizone <sup>®</sup>	(Larabi et al., 2003)
Rat, dog and human	1% hematocrit	20 min	Lipid nanoparticles and Fungizone <sup>®</sup>	(Fukui et al., 2003)
Human, human plus <i>Plasmodium</i>	2% hematocrit	48 h	Fungizone <sup>®</sup> and AmBisome <sup>®</sup>	(Wiehart et al., 2006)
Human	1% hematocrit	1 h	Liposomes and free AmB	(Khan and Owais, 2006)
Rat	Diluted	30 min	Micelles & Fungizone <sup>®</sup>	(Vandermeulen et al., 2006)
Sheep	Suspension 5%	1 h	Complexes, free AmB and AmBisome <sup>®</sup>	(Charvalos et al., 2006)
Human	2% hematocrit	30 min	Conjugates	(Nishi et al., 2007)
Sheep	Diluted	1 h	Conjugates and free AmB	(Parveen et al., 2007)
Human	Diluted 1/10	30 min	Microemulsions and Fungizone <sup>®</sup>	(Darole et al., 2008)
Human	3.5 x 10 <sup>9</sup> cells/mL	1 h	Different aggregation states of AmB, Fungizone <sup>®</sup> and heated- Fungizone <sup>®</sup>	(Espada et al., 2008)
Rat	5% hematocrit	1 h	Lipid nanoparticles, Fungizone <sup>®</sup> & AmBisome <sup>®</sup>	(Jung et al., 2009)
Sheep	2% hematocrit	1 h	Micelles	(Shao et al., 2010)
Rat	1% hematocrit	30 min	Polymersomes, Fungizone <sup>®</sup> & AmBisome <sup>®</sup>	(Jain and Kumar, 2010)
Rat	Diluted	30 min	Nanocarriers & Fungizone <sup>®</sup>	(Falamarzian and Lavasanifar, 2010)
Human	Diluted	30 min	Nanoparticles	(Shim et al., 2011)

## References

- Adams, M.L., Andes, D.R., Kwon, G.S., 2003. Amphotericin B encapsulated in micelles based on poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) derivatives exerts reduced in vitro hemolysis but maintains potent in vivo antifungal activity. *Biomacromolecules* 4, 750-757.
- Adams, M.L., Kwon, G.S., 2003. Relative aggregation state and hemolytic activity of amphotericin B encapsulated by poly(ethylene oxide)-block-poly(N-hexyl-L-aspartamide)-acyl conjugate micelles: effects of acyl chain length. *J Control Release* 87, 23-32.
- Chakraborty, K.K., Naik, S.R., 2003. Therapeutic and hemolytic evaluation of in-situ liposomal preparation containing amphotericin - beta complexed with different chemically modified beta - cyclodextrins. *J Pharm Pharm Sci* 6, 231-237.
- Charvalos, E., Tzatzarakis, M.N., Van Bambeke, F., Tulkens, P.M., Tsatsakis, A.M., Tzanakakis, G.N., Mingeot-Leclercq, M.P., 2006. Water-soluble amphotericin B-polyvinylpyrrolidone complexes with maintained antifungal activity against *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. and reduced haemolytic and cytotoxic effects. *J Antimicrob Chemother* 57, 236-244.
- Darole, P.S., Hegde, D.D., Nair, H.A., 2008. Formulation and evaluation of microemulsion based delivery system for amphotericin B. *AAPS PharmSciTech* 9, 122-128.
- Espada, R., Valdespina, S., Alfonso, C., Rivas, G., Ballesteros, M.P., Torrado, J.J., 2008. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *Int J Pharm* 361, 64-69.
- Falamazian, A., Lavasanifar, A., 2010. Chemical modification of hydrophobic block in poly(ethylene oxide) poly(caprolactone) based nanocarriers: effect on the solubilization and hemolytic activity of amphotericin B. *Macromol Biosci* 10, 648-656.
- Fukui, H., Koike, T., Saheki, A., Sonoke, S., Tomii, Y., Seki, J., 2003. Evaluation of the efficacy and toxicity of amphotericin B incorporated in lipid nano-sphere (LNS). *Int J Pharm* 263, 51-60.
- Jain, J.P., Kumar, N., 2010. Development of amphotericin B loaded polymersomes based on (PEG)(3)-PLA co-polymers: Factors affecting size and in vitro evaluation. *Eur J Pharm Sci* 40, 456-465.
- Jung, S.H., Lim, D.H., Lee, J.E., Jeong, K.S., Seong, H., Shin, B.C., 2009. Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their in vitro and in vivo characteristics. *Eur J Pharm Sci* 37, 313-320.
- Khan, M.A., Owais, M., 2006. Toxicity, stability and pharmacokinetics of amphotericin B in immunomodulator tuftsin-bearing liposomes in a murine model. *J Antimicrob Chemother* 58, 125-132.
- Larabi, M., Yardley, V., Loiseau, P.M., Appel, M., Legrand, P., Gulik, A., Bories, C., Croft, S.L., Barratt, G., 2003. Toxicity and antileishmanial activity of a new stable lipid suspension of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 3774-3779.
- Lavasanifar, A., Samuel, J., Sattari, S., Kwon, G.S., 2002. Block copolymer micelles for the encapsulation and delivery of amphotericin B. *Pharm Res* 19, 418-422.
- Mehta, R., Lopez-Berestein, G., Hopfer, R., Mills, K., Juliano, R.L., 1984. Liposomal amphotericin B is toxic to fungal cells but not to mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 770, 230-234.

- Nishi, K.K., Antony, M., Mohanan, P.V., Anilkumar, T.V., Loiseau, P.M., Jayakrishnan, A., 2007. Amphotericin B-gum arabic conjugates: synthesis, toxicity, bioavailability, and activities against *Leishmania* and fungi. *Pharm Res* 24, 971-980.
- Parveen, S., Gupta, A.D., Prasad, R., 2007. Arabinogalactan protein from *Arachis hypogaea*: role as carrier in drug-formulations. *Int J Pharm* 333, 79-86.
- Shao, K., Huang, R., Li, J., Han, L., Ye, L., Lou, J., Jiang, C., 2010. Angiopep-2 modified PE-PEG based polymeric micelles for amphotericin B delivery targeted to the brain. *J Control Release* 147, 118-126.
- Shim, Y.H., Kim, Y.C., Lee, H.J., Bougard, F., Dubois, P., Choi, K.C., Chung, C.W., Kang, D.H., Jeong, Y.I., 2011. Amphotericin B aggregation inhibition with novel nanoparticles prepared with poly(epsilon-caprolactone)/poly(n,n-dimethylamino-2-ethyl methacrylate) diblock copolymer. *J Microbiol Biotechnol* 21, 28-36.
- van Etten, E.W., van Vianen, W., Roovers, P., Frederik, P., 2000. Mild heating of amphotericin B-desoxycholate: effects on ultrastructure, in vitro activity and toxicity, and therapeutic efficacy in severe candidiasis in leukopenic mice. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1598-1603.
- Vandermeulen, G., Rouxhet, L., Arien, A., Brewster, M.E., Preat, V., 2006. Encapsulation of amphotericin B in poly(ethylene glycol)-block-poly(epsilon-caprolactone-co-trimethylenecarbonate) polymeric micelles. *Int J Pharm* 309, 234-240.
- Wiehart, U.I., Rautenbach, M., Hoppe, H.C., 2006. Selective lysis of erythrocytes infected with the trophozoite stage of *Plasmodium falciparum* by polyene macrolide antibiotics. *Biochem Pharmacol* 71, 779-790.
- Zarif, L., Graybill, J.R., Perlin, D., Najvar, L., Bocanegra, R., Mannino, R.J., 2000. Antifungal activity of amphotericin B cochleates against *Candida albicans* infection in a mouse model. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1463-1469.

## **Resumen de los objetivos y discusión de los resultados**

El objetivo de este trabajo fue evaluar la toxicidad hemolítica y el perfil farmacocinético de diferentes formulaciones de AmB con el objeto de analizar qué factores condicionan el balance eficacia/toxicidad de este fármaco. Para ello, se comparó el efecto hemolítico de diferentes sistemas de encapsulación, estados de agregación y tamaño de partícula de la AmB. La cinética del proceso hemolítico resultó ser de gran utilidad no solamente a la hora de evaluar la toxicidad de las distintas formulaciones, sino también como indicador de la liberación del fármaco a partir de los distintos sistemas de encapsulación elaborados.

Además de la toxicidad hemolítica, la distribución del fármaco en el organismo tras su administración parenteral es esencial para determinar la eficacia de la formulación. En el caso de enfermedades parasitarias como la leishmaniasis, los parásitos se acumulan preferentemente a nivel intracelular en los macrófagos del SRE, lo que hace que puedan pasar fácilmente desapercibidos, no solamente frente al sistema inmunitario del organismo hospedador, sino también frente a los fármacos administrados, que tienen que llegar al lugar de acción para poder ser efectivos. Por esta razón, se estudió el perfil farmacocinético tras la administración intravenosa de aquellas formulaciones que resultaron ser menos hemolíticas. Los estudios fueron llevados a cabo en perros beagles ya que se podría considerar que el perro es uno de los principales reservorios de la enfermedad en la cuenca mediterránea, lo que trae consigo no solamente un gran número de perros fallecidos sino también un gran riesgo de transmisión de la enfermedad al ser humano. Se evaluó la influencia de diversos factores sobre el perfil farmacocinético de la AmB tales como el tipo de formulación, la dosis administrada, la coadministración de la AmB con un agente anestésico y el estado de salud del beagle.

Las formulaciones evaluadas en este trabajo fueron las siguientes:

- AmB en estado poliagregado
- AmB en estado poliagregado sometida a diferentes ciclos de centrifugación
- AmB en estado poliagregado encapsulada en microesferas de albúmina
- AmB en estado dimérico
- AmB en estado dimérico encapsulada en microesferas de albúmina
- Fungizona<sup>®</sup> (dispersión micelar que contiene AmB en estado dimérico)

- Fungizona<sup>®</sup> calentada (obtenida tras el calentamiento a 70 °C durante 1 h induciéndose la agregación de la AmB)
- AmBisome<sup>®</sup> (AmB dimérica encapsulada en liposomas)

Las conclusiones obtenidas de los estudios de hemólisis fueron las siguientes:

En primer lugar, se observó un grupo de formulaciones caracterizadas por presentar una alta toxicidad hemolítica (por encima del 50% de hemólisis a las 24 h de incubación con los glóbulos rojos) entre las que se incluyen: AmB dimérica, AmB dimérica encapsulada, Fungizona<sup>®</sup> y Fungizona<sup>®</sup> calentada, mientras que el resto de las formulaciones mostraron una baja toxicidad hemolítica (inferior al 10% tras 24 h de incubación) entre las que se encuentran: AmB poliagregada, AmB poliagregada sometida a diferentes ciclos de centrifugación, AmB poliagregada encapsulada y AmBisome<sup>®</sup>.

En ambos casos, la encapsulación de la AmB tanto en estado poliagregado como en estado dimérico dio lugar a la reducción de la toxicidad hemolítica del fármaco; sin embargo, debido a que las microesferas de albúmina son hidrofílicas liberan el principio activo más rápidamente que otras partículas más hidrofóbicas, por lo que a las 24 h deja de observarse este efecto protector a nivel hemolítico indicativo de que la mayor parte del fármaco ha sido liberado. Este efecto protector fue mucho menos acusado en el caso de la AmB dimérica, probablemente como consecuencia del menor tamaño de partícula de la AmB dimérica que hace que se libere más rápidamente en comparación con la AmB poliagregada.

En segundo lugar, aunque la AmB poliagregada mostró una baja toxicidad hemolítica, se observaron diferencias significativas entre las diversas fracciones recogidas tras someter la formulación a sucesivos ciclos de centrifugación, de manera que, a mayor número de ciclos de centrifugación, menor tamaño de partícula de los agregados y mayor efecto hemolítico. La influencia del tamaño de partícula sobre la hemólisis también fue observada con la Fungizona<sup>®</sup> calentada. Al calentar la fungizona, se indujo la agregación de la AmB dimérica dando lugar a agregados de mayor tamaño, resultando ser una formulación menos hemolítica que la propia Fungizona<sup>®</sup>.

Con las tres formulaciones menos hemolíticas (AmB poliagregada, AmB poliagregada encapsulada en microesferas de albúmina y AmBisome<sup>®</sup>) se llevaron a cabo los estudios farmacocinéticos en perros beagles y las conclusiones observadas fueron las siguientes:

En beagles sanos, la AmB poliagregada presentó una rápida desaparición de plasma tras la administración IV a diferencia de la formulación liposomal (AmBisome<sup>®</sup>) caracterizada por tener una prolongada circulación en plasma. Sin embargo, el volumen de distribución y el tiempo medio de residencia de la formulación poliagregada resultaron ser muy superiores, pudiéndose detectar niveles de AmB en el organismo hasta 7 días después de la administración IV. La rápida eliminación de plasma junto con la lenta eliminación del organismo podrían estar relacionados con un proceso de endocitosis por parte de los macrófagos circulantes tras la administración IV de la formulación poliagregada, lo que explicaría la rápida desaparición del fármaco del torrente sanguíneo para ser acumulado en tejidos (preferentemente en los tejidos del SRE en donde se localizan los macrófagos).

Cuando se administró la misma dosis de AmB poliagregada (5 mg/kg) en perros sanos y en perros infectados por *Leishmania*, se observaron mayores concentraciones plasmáticas de fármaco en aquellos perros que estaban enfermos. Este hecho podría relacionarse con la menor actividad fagocítica descrita en macrófagos infectados por *Leishmania*, lo que explicaría que el fármaco permaneciese en plasma en mayor proporción. No obstante, este hecho también podría ser consecuencia de una mayor eliminación de AmB desde los tejidos (bazo e hígado principalmente) que se encuentran inflamados por la enfermedad o incluso, podría ocurrir que el fármaco interaccionase con el ergosterol de la membrana de parásitos que estuviesen circulando en sangre en el momento de la administración IV.

Una característica importante de la AmB es su alta unión a proteínas plasmáticas (95-99%). Este factor juega un papel clave en el perfil farmacocinético del fármaco. Al administrar dosis superiores de AmB poliagregada (10 en vez de 5 mg/kg), se observó un aumento de las concentraciones plasmáticas, sin embargo, no fue proporcional al incremento de la dosis administrada. La mayor dosis administrada de AmB podría producir una saturación de las proteínas plasmáticas, dando lugar a un excedente de fármaco que sería eliminado más rápidamente del torrente sanguíneo. Por otro lado, si previamente a la administración IV de AmB poliagregada, se administra un anestésico

(medetomidina) con alta unión a proteínas plasmáticas, se puede producir una interacción en la distribución de ambos fármacos que competirían por la unión a las proteínas plasmáticas, razón que explicaría la disminución de las concentraciones plasmáticas de AmB poliagregada además de la sinergia en la aparición de ciertos efectos adversos producidos tales como la hipotensión, que llega a prolongarse hasta 4 – 5 h tras la administración del fármaco. Sin embargo, si la AmB poliagregada está encapsulada en microesferas de albúmina, no se observa dicha interacción cuando se co-administra con un anestésico, ya que el fármaco no tiene que competir por la unión a proteínas plasmáticas, puesto que se encuentra unido a la albúmina de las microesferas.

En conclusión, la AmB poliagregada bien libre o encapsulada en microesferas de albúmina ha demostrado tener un favorable comportamiento en términos de toxicidad hemolítica, presentando mínima toxicidad sobre glóbulos rojos y un adecuado perfil farmacocinético, especialmente a la hora de tratar enfermedades como la leishmaniasis donde es necesario vectorizar el fármaco a los órganos del SRE (hígado y bazo). En comparación con el AmBisome<sup>®</sup>, la AmB poliagregada se puede administrar en dosis elevadas (de hasta 10 mg/kg sin mostrar síntomas de toxicidad) además de ser una formulación donde la relación coste-eficacia mantiene un nivel aceptable.

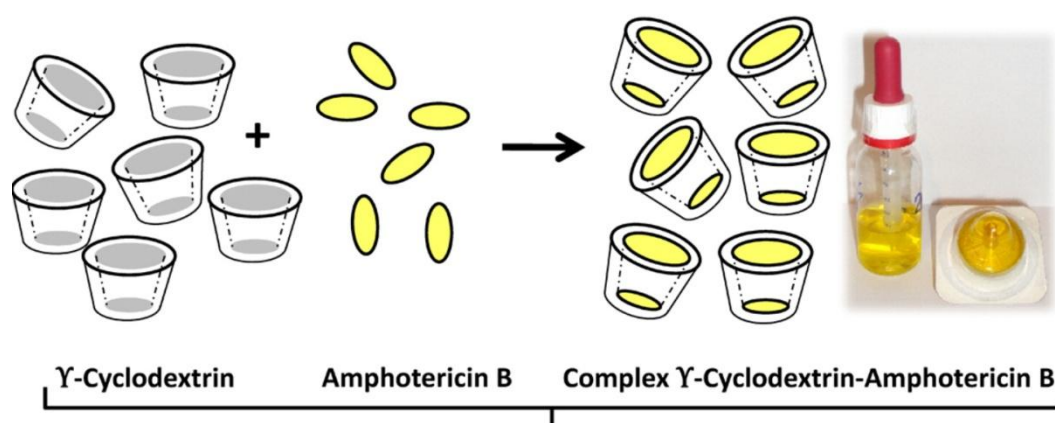


## **3.2. Segunda publicación**

*A novel formulation of solubilised amphotericin B designed for ophthalmic use*

**International Journal of Pharmaceutics 437 (2012) 80– 82**

## Graphical abstract



- **SOLUBILISED AMPHOTERICIN B** for ophthalmic application
- Suitable for sterile filtration
- $\gamma$ -cyclodextrin increases antifungal activity of amphotericin B
- Chemically and physically stable for four weeks



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijpharm](http://www.elsevier.com/locate/ijpharm)

## Note

## A novel formulation of solubilised amphotericin B designed for ophthalmic use

D.R. Serrano<sup>a</sup>, H.K. Ruiz-Saldaña<sup>a</sup>, G. Molero<sup>b</sup>, M.P. Ballesteros<sup>a</sup>, J.J. Torrado<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramon y Cajal, 28040 Madrid, Spain<sup>b</sup> Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramon y Cajal, 28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 May 2012

Received in revised form 27 July 2012

Accepted 29 July 2012

Available online 4 August 2012

## Keywords:

Cyclodextrins

Amphotericin B

Eye drops

Stability

Antifungal activity

## ABSTRACT

Amphotericin B (AmB) is a wide spectrum antifungal with low incidence of clinical resistance. However, there are no licensed topical formulations with AmB in most developed countries. Extemporaneous preparations of AmB are frequently prepared from available marketed parenteral formulations. Herein, a solution of AmB with  $\gamma$ -cyclodextrin is described as suitable for topical administration as eye drops. This novel formulation is characterised by its ability to solubilise AmB and to maintain its antifungal activity, physicochemical stability and sterility over 30 days. Antifungal activity against *Candida albicans* was significantly higher (35%) for the new formulation than that obtained with Fungizone® based extemporaneous prepared suspension. Optimal 0.1% AmB–10% cyclodextrin formulation remained sterile and with an acceptable osmolality, pH and particle size for ophthalmic use over 4 weeks. Complexation with  $\gamma$ -cyclodextrins improved AmB chemical stability compared to the reference eye drops suspension based on Fungizone®. These results illustrate the feasibility of an ophthalmic AmB formulation easy enough to be licensed or prepared in community and hospital pharmacies.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

Fungal keratitis which is mainly caused by *Candida* is responsible for corneal blindness. Nowadays, it is the second most common cause of blindness in developing countries and the first cause in Asia (Kaur et al., 2008). Freshly prepared topical amphotericin B (0.1–0.3%) is the standard treatment for these ocular infections (Thomas, 2003). Eye drop solutions are the most convenient dosage form for ocular administration (Tiruchera and Mitra, 2003). Thus, patients rely on extemporaneously dispensed off-label formulations prepared by pharmacists. Nevertheless, aqueous suspensions of AmB are difficult to filter sterilise and cause local irritation associated with the particle size (Rathore and Nema, 2009). Fungizone® is considered the standard AmB formulation. However, it contains deoxycholate that renders its instillation painful leading to poor compliance. Lipidic formulations, such as liposomal AmBisome® can be a good option (Morand et al., 2007) but cost limits this off-label use. Hence, there is a clinical need to develop an ocular AmB solution and this is the aim of this work.

Cyclodextrins are able to enhance the local bioavailability of drugs and their use as solubiliser and stabiliser agents has been approved for ophthalmic applications (Loftsson and Järvinen, 1999; Loftsson and Stefánsson, 2002; Jansook and Loftsson, 2009). AmB solubilisation is the first step for the development of an ophthalmic solution. Two different formulations were prepared depending on the AmB concentration (0.05 or 0.1%). To obtain a 0.05% concentration, 5.75 g of  $\gamma$ -cyclodextrin (Cavamax W8, ISP) were dissolved

in 50 mL of either saline solution (0.9%, w/v) or a dextrose solution (5%, w/v). Once dissolved, sodium hydroxide was added to increase the pH to 12.0 and 57.5 mg of AmB (supplied by Azelis, Spain) were added. As soon as AmB was dissolved, orthophosphoric acid was added to adjust pH to 7.4. Finally, either saline or dextrose solution were added up to 100 mL. The obtained AmB solution was sterilised by filtering (0.22  $\mu$ m, Minisart NML® Sartorius) in a laminar flow hood. The osmolality in 5% dextrose solution was  $446.6 \pm 0.2$  mOsm/L (Knauer osmolarimeter). Other three formulations (with 0.1% AmB concentration) were similarly prepared using deionized water and three different  $\gamma$ -cyclodextrin concentrations (10, 12.5 and 15%). To ensure sterility once the sealed container is opened, 0.005% Thimerosal® (Sigma–Aldrich®) was added as an antiseptic agent (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009). The osmolality of 0.1% AmB–10% cyclodextrin was  $212.4 \pm 0.2$  mOsm/L which is well tolerated by the eye (Wilson et al., 2001). Three replicates of each formulation were prepared. Statistical analysis (Tukey's test – ANOVA one-way) were carried out with Minitab® 15 considering *P*-values < 0.05 as statistical significant difference.

AmB activity depends on its aggregation state (Torrado et al., 2008), which is influenced by the formulation and can be studied by spectrophotometry (Sánchez Brunete et al., 2004; Espada et al., 2008a). AmB is in the monomer form in the cyclodextrin formulations and in the dimer form in Fungizone®. Antifungal activity of the new and reference formulations were tested against *Candida albicans* CECT 1394 by the agar diffusion assay (European Pharmacopoeia, 2009). Antifungal sensitivity was assayed in agar Mueller Hinton medium supplemented with glucose (2%, w/v) and

\* Corresponding author. Tel.: +34 913941620; fax: +34 913941736.  
E-mail address: [torrado1@farm.ucm.es](mailto:torrado1@farm.ucm.es) (J.J. Torrado).



**Table 1**

Mean data of formulation characteristics. Key: AmB-CDSS: AmB cyclodextrin complex in saline solution, AmB-CDGlucose: AmB cyclodextrin complex in dextrose solution. AmB and  $\gamma$ -CD concentration was 0.05 and 5% respectively. Fungizone®Glucose is the reference formulation reconstituted in dextrose solution. Statistical differences by temperature effect are shown by +; differences by time effect compared to day 0 are represented by #; differences between Fungizone®Glucose and the other formulations are shown by \*.

Assay	Formulation	Day 0	Day 7 (22 ± 4 °C)	Day 7 (5 ± 3 °C)	Day 15 (22 ± 4 °C)	Day 15 (5 ± 3 °C)	Day 30 (22 ± 4 °C)	Day 30 (5 ± 3 °C)
Size (nm)	Fungizone®Glucose	1.6	0.9	0.9	4586.7 <sup>#</sup>	4850 <sup>#</sup>	11,300	21,420 <sup>#</sup>
	AmB-CDSS	1.2	4.2	0.96	2.2 <sup>*</sup>	657.3	1.8 <sup>*</sup>	1964.7 <sup>#</sup>
	AmB-CDGlucose	1.0	0.6	0.9	50.7 <sup>*</sup>	48.7	372.7 <sup>*</sup>	1102 <sup>#</sup>
AmB concentration (%)	Fungizone®Glucose	100	89.5 <sup>#</sup>	91.4 <sup>#</sup>	83.4 <sup>#</sup>	(86.9 <sup>+</sup> ) <sup>#</sup>	70.1 <sup>#</sup>	(80.3 <sup>+</sup> ) <sup>#</sup>
	AmB-CDSS	100	99.6	97.4	98.6	92.7	99.4 <sup>*</sup>	97.5
	AmB-CDGlucose	100	91.6 <sup>#</sup>	96.7 <sup>+</sup>	83.1 <sup>#</sup>	(91.8 <sup>+</sup> ) <sup>#</sup>	76.6 <sup>#</sup>	(89.1 <sup>+</sup> ) <sup>#</sup>
Antifungal activity (inhibition hale, mm)	Fungizone®Glucose	21.8	–	–	–	–	21.2	21.1
	AmB-CDSS	28.6	–	–	–	–	28.3 <sup>*</sup>	28.4 <sup>*</sup>
	AmB-CDGlucose	29.5	–	–	–	–	29.1 <sup>*</sup>	29.1 <sup>*</sup>
Sterility	AmB-CDSS	Yes	–	–	–	–	Yes	Yes
	AmB-CDGlucose	Yes	–	–	–	–	Yes	Yes

**Table 2**

Mean data of formulation characteristics at 22 ± 4 °C. Key: Fungizone®Glucose is the reference formulation reconstituted in dextrose solution, AmB-CDThimerosal: AmB cyclodextrin complex in aqueous solution with 0.005% Thimerosal®. Statistical differences between Fungizone®Glucose and the other formulations are shown by \*; differences caused by time effect compared to day 0 are represented by #.

Assay	Concentration AmB– $\gamma$ CD (%)	Formulation	Day 0	Day 7	Day 15	Day 30
Size (nm)	–	Fungizone®Glucose	1.6	0.9	4586.7 <sup>#</sup>	11,300
	0.1–10	AmB-CDThimerosal	1.8	0.9	571.9	1873.0 <sup>#</sup>
	0.1–12.5	AmB-CDThimerosal	0.9	137.3	1583.0 <sup>#</sup>	3497.0 <sup>#</sup>
	0.1–15	AmB-CDThimerosal	0.9	878.7 <sup>+</sup> #	2683.3 <sup>+</sup> #	204,666.7 <sup>+</sup> #
AmB concentration (%)	–	Fungizone®Glucose	100	89.5 <sup>#</sup>	83.4 <sup>#</sup>	70.1 <sup>#</sup>
	0.1–10	AmB-CDThimerosal	100	104.7 <sup>*</sup>	103.2 <sup>*</sup>	99.8 <sup>*</sup>
	0.1–12.5	AmB-CDThimerosal	100	102.5 <sup>*</sup>	103.8 <sup>*</sup>	96.8 <sup>*</sup>
	0.1–15	AmB-CDThimerosal	100	104.8 <sup>*</sup>	99.6	79.3 <sup>#</sup>
Sterility	0.1–10	AmB-CDThimerosal	Yes	–	–	Yes
	0.1–12.5	AmB-CDThimerosal	Yes	–	–	Yes
	0.1–15	AmB-CDThimerosal	Yes	–	–	Yes

0.5  $\mu$ g/mL methylene blue (see further details in [Supplementary materials](#)). Antifungal activity of the 0.05% AmB–5% cyclodextrin formulation with no Thimerosal® was statistically significantly ( $P < 0.05$ ) higher (35%) than the reference formulation Fungizone® (Table 1).

Treatment of fungal keratitis is required over 3–4 weeks to achieve complete remission. Thus, the antifungal activity as well as the stability/sterility has to be guaranteed for this period of time. Sterility of the formulation was achieved by filtration and the addition of 0.005% of Thimerosal®. Tables 1 and 2 show the sterility tests carried out with different AmB formulations (0.05% and 0.1% at day 0 as monodose formulations and 0.1% at day 30 simulating a multidose regime) by a closed-membrane filtration method (Steritest, Millipore®). Trypticase Soy Broth and Fluid Thioglycollate Medium were used. Samples were incubated for 14 days. The absence of turbidity in both media in all the formulations indicated no microorganism growth and thus, sterility.

Aggregation effect was studied by laser diffractometry (Microtrac S3500) and dynamic light scattering (Zetatract). An increased aggregation tendency when samples were stored at low temperatures (5 ± 3 °C) was observed (Table 1). Complexation with cyclodextrins is shown to delay the self aggregation of AmB although at higher proportions than 12.5% induces aggregation (Table 2). Additionally, solid particles for ophthalmic use should not surpass 5–10  $\mu$ m of diameter for patient comfort (Rathore and Nema, 2009) which indicates that cyclodextrin concentrations between 5 and 12.5% would be suitable for clinical use along 30 days.

Chemical degradation was assayed by a validated HPLC method (Espada et al., 2008b). Cyclodextrins delayed AmB chemical degradation (Tables 1 and 2). Fungizone® concentration was reduced ( $P < 0.05$ ) compared to AmB (0.1%)–cyclodextrin (10%) formulation is more than 10% at day 7 and a 30% at day 30. Storage of samples at low temperature significantly delayed AmB chemical degradation, although it increased AmB aggregation.

In conclusion, 0.1% AmB–10%  $\gamma$ -cyclodextrin is an optimal ophthalmic formulation that is easy to prepare by pharmaceuticals, relatively low-cost, physico-chemically stable, well tolerated osmolality and sterile during 4 weeks, which makes it suitable for its clinical use. However, further toxicological and clinical studies should be done prior to its use in humans.

#### Acknowledgements

D.R. Serrano acknowledges the Ministerio of Education for her FPU fellowship. This work has been partially funded by a grant from UCM and CCAA Madrid to the research group 910939.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.07.065>.

## References

- Espada, R., Valdespina, S., Alfonso, C., Rivas, G., Ballesteros, P., Torrado, J.J., 2008a. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *Int. J. Pharm.* 361, 64–69.
- Espada, R., Josa, J.M., Valdespina, S., Dea, M.A., Ballesteros, M.P., Alunda, J.M., Torrado, J.J., 2008b. HPLC assay for determination of amphotericin B in biological samples. *Biomed. Chromatogr.* 22, 402–407.
2009. European Pharmacopoeia, 6th ed. The Council of Europe, pp. 5158–5160, Strasbourg.
2009. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th ed, pp. 736–739.
- Kaur, I.P., Rana, C., Singh, H., 2008. Development of effective ocular preparations of antifungal agents. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 24, 481–493.
- Jansook, P., Loftsson, T., 2009. Cyclodextrins as solubilizers: effects of excipients and competing drug. *Int. J. Pharm.* 379, 32–40.
- Loftsson, T., Stefánsson, E., 2002. Cyclodextrins in eye drop formulations: enhanced topical delivery of corticosteroids to the eye. *Acta Ophthalmol. Scand.* 80, 144–150.
- Loftsson, T., Järvinen, T., 1999. Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36, 59–79.
- Morand, K., Bartoletti, A.C., Bochot, A., Barratt, G., Brandely, M.L., Chast, F., 2007. Liposomal amphotericin B eye drops to treat fungal keratitis: physico-chemical and formulation stability. *Int. J. Pharm.* 344, 150–153.
- Rathore, K.S., Nema, R.K., 2009. An insight into ophthalmic drug delivery system. *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* 1, 1–5.
- Sánchez Brunete, J.A., Dea, M.A., Rama, S., Bolás, F., Alunda, J.M., Torrado, S., Torrado, J., 2004. Amphotericin B molecular organization as an essential factor to improve activity/toxicity ratio in the treatment of visceral leishmaniasis. *J. Drug Target.* 12, 453–460.
- Thomas, P.A., 2003. Fungal infections of the cornea. *Eye* 17, 852–862.
- Torrado, J.J., Espada, R., Ballesteros, M.P., Torrado, S., 2008. Amphotericin B formulations and drug targeting. *J. Pharm. Sci.* 97, 2405–2425.
- Tiruchera, G.S., Mitra, A.K., 2003. Effect of hydroxypropyl beta cyclodextrin complexation on aqueous solubility, stability and corneal permeation of acyl ester prodrugs of ganciclovir. *AAPS PharmSciTech* 4 (article 45).
- Wilson, C.G., Zhu, Y.P., Kurmala, P., Roo, S., Dhillon, D., 2001. Ophthalmic drug delivery. In: *Drug Delivery and Targeting*, 1st ed, pp. 298–319.

## Supplementary data

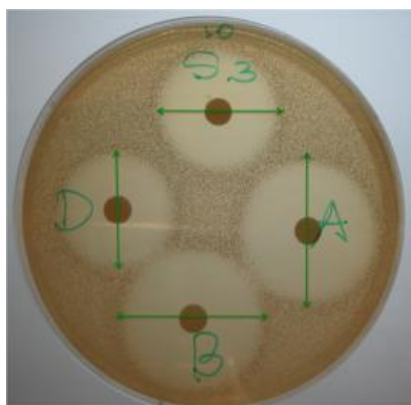
### Filtration retention

The retention of AmB in filtration membranes of 0.22  $\mu\text{m}$ , (Minisart NML® Sartorius) was of approximately 15% and it was compensated weighting an excess of AmB.

### Antifungal activity measurement

Antifungal activity of the new and the reference formulations were tested against *Candida albicans* CECT 1394 by agar diffusion assay (European Pharmacopoeia, 2009). Briefly, Mueller Hinton Agar (MHA) supplemented with glucose (2% w/v) and 0.5  $\mu\text{g/mL}$  methylene blue was sterilized by autoclaving, allowed to cool to 55  $^{\circ}\text{C}$ , and then inoculated with 3 ml per liter of a *C. albicans* CECT 1394 solution adjusted to 600 nm 0.1 absorbance.

Reference AmB solutions were prepared by dissolution in dimethyl sulfoxide at concentrations of 15.4, 38.4, 96, 240 and 600  $\mu\text{g/mL}$ . Eye drop formulation (AmB-Cyclodextrin) was diluted to a final AmB concentration of 96  $\mu\text{g/mL}$ . Paper discs were impregnated with 20  $\mu\text{L}$  of each reference and test formulations and allowed to dry during 15 minutes at room temperature. Then discs were placed on Petri dishes with the inoculated MHA medium. Petri dishes were kept at 5 $^{\circ}\text{C}$  for 4 hours and then incubated at 30 $^{\circ}\text{C}$  for 48 hours. After the incubation, antifungal activity was measured by comparison of the formulation inhibition halo diameter with the halos produced by the reference solutions. See figure 1 as an example.



**Figure 1.** Inhibition halo obtained with the different formulations in the microbiological assay. S3: reference AmB solubilized in dimethyl sulfoxide at 96  $\mu\text{g/mL}$ ; D: Fungizone® diluted to 96  $\mu\text{g/mL}$ ; A and B: AmB-Cyclodextrin formulation diluted to 96  $\mu\text{g/mL}$ .

## Resumen de los objetivos y discusión de los resultados

El objetivo de este trabajo fue desarrollar una formulación de AmB que reuniese las características adecuadas para ser administrada por vía ocular, sea de fácil preparación y estable durante un periodo de al menos 30 días. Normalmente para el tratamiento de infecciones oculares graves, se prepara en los servicios de farmacia hospitalaria y/o comunitaria un colirio a partir de Fungizona<sup>®</sup>, que presenta ciertas limitaciones tales como irritación local por el desoxicolato sódico (excipiente de la formulación) o baja estabilidad.

Se preparó un complejo formado por AmB y  $\gamma$ -CD (excipiente aprobado para administración ocular) y se evaluó su estabilidad durante un periodo de 30 días. Se estudió la influencia de diversos factores tales como la proporción empleada de AmB:  $\gamma$ -CD, la temperatura de almacenamiento del colirio, el medio utilizado para la preparación de la formulación y la incorporación de un agente bacteriostático (Timerosal<sup>®</sup>). Para evaluar la estabilidad de la formulación se determinaron ciertos parámetros críticos en formulaciones destinadas a la vía ocular como la esterilidad, el pH, la osmolaridad y el tamaño de partícula, además de otros factores claves en cualquier formulación como el contenido de principio activo y la eficacia (actividad antifúngica *in vitro*).

Las conclusiones obtenidas de este estudio son las siguientes:

En primer lugar, el empleo de  $\gamma$ -CD como excipiente permite solubilizar la AmB en forma monomérica, obteniéndose una solución que puede ser esterilizada por filtración (0.22  $\mu$ m), a diferencia de la Fungizona<sup>®</sup> en donde la AmB se encuentra en estado dimérico. La incorporación de un agente bacteriostático en la formulación (Timerosal<sup>®</sup>) demostró ser efectivo a la hora de mantener la esterilidad del colirio en uso durante al menos 30 días a temperatura ambiente ( $22 \pm 4$  °C).

En segundo lugar, la actividad antifúngica *in vitro* del complejo AmB:  $\gamma$ -CD resultó ser un 35% mayor que la formulación de referencia (Fungizona<sup>®</sup> reconstituida en medio glucosado). Además, la actividad antifúngica se mantuvo constante durante 30 días cuando la formulación se almacenó entre 2 – 8 °C, pero también cuando se mantuvo a temperatura ambiente ( $22 \pm 4$  °C).

En tercer lugar, debido a la baja solubilidad de la AmB en medios acuosos, ésta tiende a agregarse dando lugar a partículas de gran tamaño que pueden limitar su aplicación por vía ocular produciendo una sensación de molestia al paciente, especialmente cuando el tamaño de los agregados es superior a 5 – 10  $\mu\text{m}$ . El complejo AmB:  $\gamma$ -CD permite prevenir o retrasar la agregación de la AmB en medios acuosos en comparación con la formulación de referencia. Sin embargo, si la formulación contiene una concentración de  $\gamma$ -CD superior o igual al 12.5%, el proceso de agregación se acentúa drásticamente, limitando su uso. La temperatura de almacenamiento también juega un papel importante, de hecho, a bajas temperaturas (2 – 8 °C), la estabilidad física de la formulación se ve reducida, ya que el tamaño de partícula de los agregados formados es mayor que a temperatura ambiente ( $22 \pm 4$  °C). El proceso de agregación entre 2 – 8 °C es más marcado cuando el medio empleado es suero salino al 0.9% en vez de suero glucosado al 5%, probablemente como consecuencia de una interacción con el principio activo que favorece la precipitación del fármaco.

También hay que destacar que la  $\gamma$ -CD evita o retrasa la degradación de la AmB en medios acuosos, siendo la estabilidad química del complejo AmB:  $\gamma$ -CD superior a la formulación de referencia. El almacenamiento de la formulación a bajas temperaturas (2 – 8 °C) aunque induce la agregación, disminuye la degradación de la AmB.

En conclusión, el complejo AmB:  $\gamma$ -CD (en la proporción de 0.1% AmB, 10%  $\gamma$ -CD y 0.005% Timerosal<sup>®</sup>) a temperatura ambiente, podría ser una óptima formulación para el tratamiento de infecciones fúngicas oculares ya que presenta mayor actividad antifúngica que la Fungizona<sup>®</sup>, es económica, fácil de preparar, reúne las características adecuadas para ser usada a nivel ocular tales como pH 7.4, aceptable osmolaridad (212 mOsm/L), esterilidad y estabilidad físico-química durante al menos 30 días.



### **3.3. Tercera publicación**

*Oral particle translocation to lung, liver and spleen confers oral amphotericin B activity in visceral leishmaniasis*

**Pendiente de publicación**

**Oral particle translocation to lung, liver and spleen confers oral amphotericin b activity in visceral leishmaniasis**

Dolores R. Serrano<sup>a,b</sup>, Aikaterini Lalatsa<sup>b</sup>, M. Auxiliadora Dea<sup>c,d</sup>, Pablo Bilbao<sup>c</sup>, M. Paloma Ballesteros<sup>a</sup>, Andreas G. Schätzlein<sup>b</sup>, Francisco Bolás<sup>c</sup>, Juan J. Torrado<sup>a</sup>, Ijeoma F. Uchegbu<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramon y Cajal s/n, Madrid, 28040, Spain.

<sup>b</sup>UCL School of Pharmacy, University of London, 29-39, Brunswick Square, London, WC1N 1AX, UK.

<sup>c</sup>Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramon y Cajal s/n, Madrid, 28040, Spain.

<sup>d</sup>Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Cardenal Herrera-CEU, Moncada, 46113 Valencia, Spain.

**\*Corresponding author**

Postal address: department of Pharmaceutics, UCL School of Pharmacy, University of London, 29-39, Brunswick Square, London, WC1N 1AX, UK; email address: [ijeoma.uchegbu@ucl.ac.uk](mailto:ijeoma.uchegbu@ucl.ac.uk);

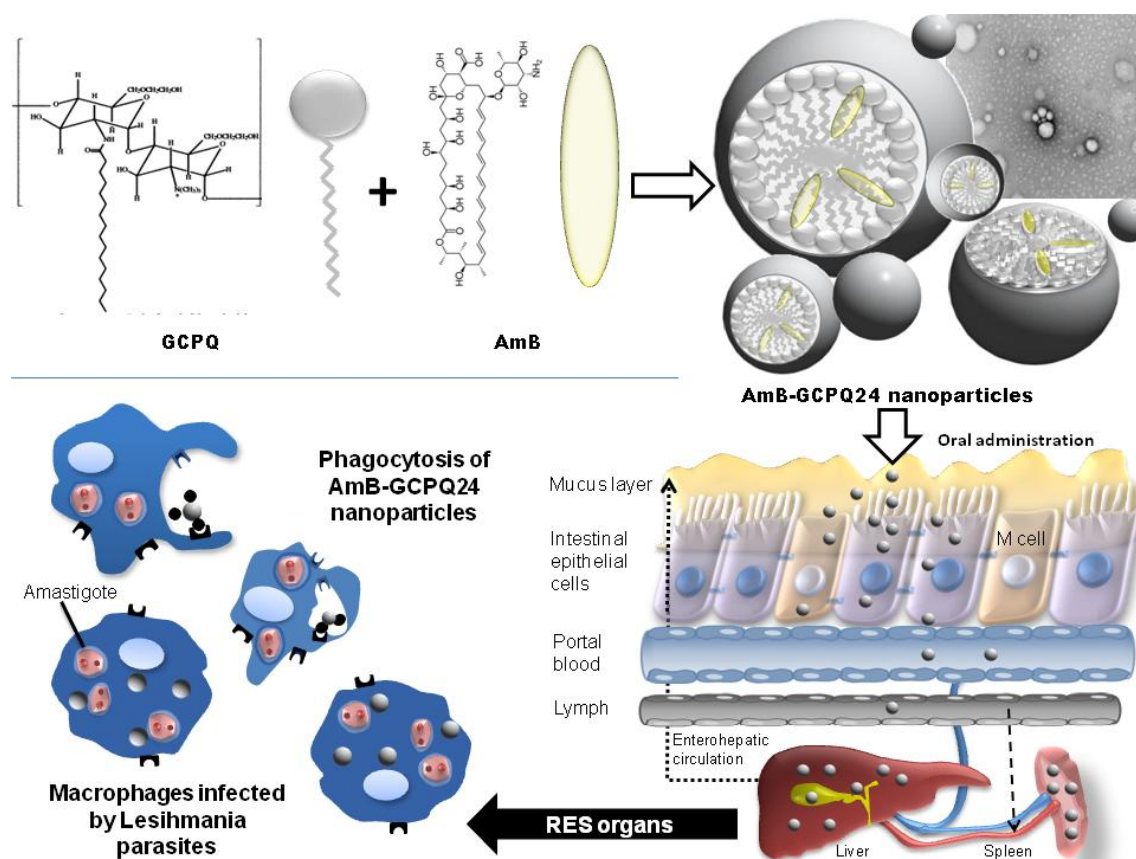
Tel: +44 207 753 5997; Fax: +44 207 753 5942.

## **Abstract**

Amphotericin B (AmB) is one of the drugs of choice for the treatment of visceral leishmaniasis which is fatal if left untreated. Its use is limited by its nephrotoxicity and parenteral administration which obliges to prolonged hospitalization and suspension of the treatment especially in the developing countries where there is a higher prevalence of the disease. Thus, an oral therapy of AmB can expand the access for treatment. However, the oral absorption of AmB is very limited due to its poor solubility and oral permeability. We have designed a nanomedicine from chitosan amphiphile able to deliver orally the AmB in enough concentration to elicit its pharmacological effect. The nanomedicine significantly enhanced the oral absorption of the AmB (oral bioavailability of 24.7%) resulting in  $98.9\% \pm 1.2\%$  and  $92.1\% \pm 7.5\%$  suppression of parasite replication in liver and spleen respectively. It can be considered a safer formulation because the AmB levels reached in liver, spleen and lungs were higher with respect to kidney concentration obtaining a favourable risk- benefit ratio. Moreover, we have shown that the AmB nanomedicine enables the oral absorption of the drug not only in rodents but also in other mammalian species like the dog.

**Keywords:** Amphotericin B, oral delivery, nanoparticles, quaternary ammonium palmitoyl glycol chitosan, pharmacokinetics, antileishmanial activity.

## Graphical abstract



## **1. Introduction**

AmB is one of the most effective antifungal drugs used for the treatment of life-threatening fungal systemic infections such as candidiasis or aspergillosis [1]. Its use in clinical practice has been widely expanded because of the increase of opportunistic fungal infections especially in immunocompromised patients such as transplant recipients, patients with AIDS or undergoing immunosuppressive chemotherapy [2, 3]. Also AmB is indicated for the treatment of visceral leishmaniasis due to its very high cure rate and few reports of resistance [4, 5]. This involves an important advantage in the therapeutic arsenal against leishmaniasis taking into account the increasing resistance to antimonial drugs such as sodium stibogluconate and meglumine antimoniate [5]. Although AmB remains the drug of choice [5, 6], its usefulness is limited mainly by its nephrotoxicity and infusion-related side effects such as infection of the indwelling catheter, thrombophlebitis, fever, chills, nausea, vomiting, headache, haemolysis and bone pain [7, 8]. Reduction of AmB nephrotoxicity has been achieved by utilising lipid-based formulations such as liposomes (AmBisome<sup>®</sup>), lipid complexes (Abelcet<sup>®</sup>) and colloidal lipid dispersions (Amphotec<sup>®</sup>; Amphocil<sup>®</sup>) [8]. However, all these marketed AmB formulations still require parenteral administration and hospitalization which hampers the access to treatment especially in the developing countries. Therefore, the development of an oral formulation of AmB is appealing for improving patient compliance and reducing infusion-related side effects as a high peak concentration of AmB would not be reached in systemic circulation which is related to toxicity.

To date, oral formulations of AmB are intended for treating infections localised in the oral cavity and the gastrointestinal tract or as a prophylactic agent especially when the risk of systemic exposure is high [9]. However, formulating AmB as an oral medicine for the treatment of systemic fungal and parasitic infections remains still a challenge because of its poor oral bioavailability [10]. Since the fifties, multiple attempts to deliver orally AmB (many of them based on dosing large amounts of the drug) have been carried out without great success [11-13]. Its zwitterionic and amphiphilic nature associated with the asymmetrical distribution of its hydrophilic and hydrophobic groups contributes to both its low aqueous solubility at physiological pH ( $< 1 \text{ mg L}^{-1}$ ) and low membrane permeability ( $\log P = 0.95$ ) by which is classified as a Biopharmaceutical

Classification System class IV drug [8, 14-16]. Moreover, the oral bioavailability of the AmB is limited by degradation in the acidic gastric milieu [17].

Over the last decade, the development of an oral formulation of AmB has been largely boosted as an attempt to allow fungal and antileishmanial treatment to reach developing countries. Many different oral formulations such as lipid based systems, nanosuspensions, nanoparticles, bile salts based formulations, carbon nanotubes and cochleates have been trialed [16-34]. Although there has been a substantial improvement, very few systems have progressed as oral AmB formulations beyond the proof-of-concept stage to clinical trials. However, there is a significant clinical need to treat visceral leishmaniasis imposed by an infection rate close to one person per minute and high mortality associated with untreated disease [35] necessitating more effective oral formulations to be developed.

The hypothesis underpinning this work was to develop a quaternary ammonium palmitoyl glycol chitosan (GCPQ) nanomedicine of AmB able to protect AmB in the acid environment of the stomach and able to increase its solubility within the intestinal lumen while being able to permeate across the intestinal mucosa in adequate amounts able to halt the proliferation of the parasite in clinical relevant tissues. GCPQ amphiphiles form highly stable nanoparticles encapsulating low soluble drugs able to promote increased dissolution in the intestinal lumen and enhanced their passive diffusion and oral permeability by allowing adherence of the nanoparticles to the unstirred layer enjoying a prolonged residence time within the absorptive upper gastrointestinal tract [36]. GCPQ nanoparticles have also afforded protection from acid denaturation of peptides in the acid pH and gastrointestinal enzymatic degradation [37]. To test the hypothesis, the oral absorption and biodistribution of the AmB following single or multiple oral administrations of the nanoparticles were assessed. The percentage of dose recovery and the oral bioavailability of the AmB were determined. AmB concentration levels were quantified in plasma and in major target organs such as spleen, liver, lung, bone marrow and brain, as reduction in parasite load in these organs correlates to AmB clinical efficacy. Additionally other targeted organs where AmB toxicity is manifested such as kidneys were also analysed. Anti-leishmanial activity in infected mice with *L. infantum* (which is responsible for one of the most lethal form of the disease: visceral leishmaniasis [38]) was also assessed in order to correlate with the increase in oral bioavailability of AmB.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Materials**

AmB was supplied by Azelis (Barcelona, Spain). AmBisome<sup>®</sup> was purchased from Gilead Sciences S.L. (Madrid, Spain). All reagents and chemicals used without further purification were obtained from Sigma Aldrich Chemical Co (Poole, UK or Madrid, Spain) and solvents (HPLC grade) and acids from Fisher Scientific (Loughborough, UK) or VWR (Lutterworth, UK) unless otherwise stated. Visking dialysis membranes were obtained from Medicell International Ltd. (London, UK). Methanol-d<sub>6</sub> was purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Inc (Cheshire, UK). Sodium deoxycholate was supplied by Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland) and dibasic sodium phosphate and monobasic sodium phosphate were purchased from Panreac S.A. (Barcelona, Spain).

### **2.2. Polymer synthesis and characterization**

GCPQ was synthesized as previously described with modifications [36, 39, 40]. Briefly, acid degradation of glycol chitosan (GC) was carried out dissolving GC (5 g) in hydrochloric acid (4 M, 380 mL) at 50 °C for 24 h. The purification of the product was performed by exhaustive dialysis (MWCO = 3500 Da) against water over 24 h. After dialysis, the product was lyophilised obtaining 2.57 g of a cream-colored cotton-like solid (GC24). GC24 (2.57 g) and sodium bicarbonate (1.93 g) were dissolved in 515 mL of ethanol: water (1:3.167). Palmitic acid N-hydroxysuccinimide (4.07 g) was dissolved in ethanol (772 mL) and then was added dropwise into the GC24 solution mixture with continuous stirring for 72 h protected from light. Afterwards, ethanol was removed by evaporation and the remaining aqueous phase was extracted with diethyl ether (x 3) followed by exhaustive dialysis (MWCO = 12000 Da) against water over 24 hours. After dialysis, the product was freeze-dried resulting in 4.67 g of white cotton-like solid (PGC). PGC (4.67 g) was dispersed in N-methyl-2-pyrrolidone (392 mL) for 1 h at room temperature. Sodium hydroxide (625.4 mg), sodium iodide (696.9 mg) and methyl iodide (7.819 mL or 17.82 g) were added and the reaction mixture was left stirring at 36°C under nitrogen flow for 3 h. Then, diethyl ether was added to the reaction mixture to precipitate GCPQ. The resulting solid was dispersed in water and dialysed (MWCO 7000 Da) exhaustively against water over 24 hours. After that, the quaternary ammonium iodide salt was passed through an Amberlite column (IRA-96 Cl-1)

previously packed and washed firstly with hydrochloric acid (1 M) and then with water until being achieving a neutral pH. After passing through the column, the clear eluate (GCPQ24) was lyophilised resulting in a light brown fibrous solid (2.43 g).

**Nuclear Magnetic Resonance (NMR).**  $^1\text{H}$  NMR was carried out as previously described [39, 40].  $^1\text{H}$  NMR experiments were performed on a Bruker AMX 400 MHz spectrometer (Bruker Instruments, Coventry, UK). GCPQ24 (3 mg) was analyzed in deuterated methanol (0.6 mL). To determine the level of palmitoylation, it was compared the ratio between palmitoyl methyl protons ( $\delta = 1.30\text{-}1.40$ ) and sugar methine/methylene protons ( $\delta = 3.5\text{-}4.5$ ). The level of quaternization was calculated based on the ratio of quaternary ammonium methyl protons ( $\delta = 3.4$ ) to sugar methine/methylene protons ( $\delta = 3.5\text{-}4.5$ ). The Hydrophobicity Index was calculated based on the ratio between palmitoylation (mole %) and quaternary ammonium groups (% mole).

**Gel Permeation Chromatography- Multiangle Laser Light Scattering (GPC-MALLS).** The molecular weights of GC24 and GCPQ24 were determined as previously described [36, 41] using a Wyatt gel permeation chromatography-multi-angle light scattering instrument equipped with Dawn Heleos II MALLS detector ( $\lambda = 658\text{ nm}$ ), Optilab rEX interferometric refractometer ( $\lambda = 658\text{ nm}$ ) and quasielastic light scattering (QELS) detectors (Wyatt technology Corporation, Santa Barbara, CA, USA).

**Fourier-Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR).** The infrared absorption spectra was recorded as previously described [37] by using a Perkin-Elmer Spectrum 100 FTIR spectrometer equipped with a Universal Attenuated Total Reflectance accessory and a zinc selenide crystal ( $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ ) and Spectrum FTIR software.

**Transmission Electron Microscopy (TEM).** TEM was performed using a FEI CM120 BioTwin transmission electron microscope (Philips, Eindhoven, The Netherlands) operating at 120 KV. AMT digital camera was used to capture the images. A drop of sample was placed onto a Formvar/carbon coated grid, blotting off the excess sample with Whatman No. 1 filter paper. Samples were negatively stained with 1% w/v uranyl acetate aqueous solution.

**Photon Correlation Spectroscopy (PCS).** Particle size was measured by PCS on a Malvern Zetasizer 3000 HS<sub>A</sub> (Malvern Instruments, Malvern, UK) at 25 °C, a



wavelength of 633 nm and a detection angle of 90°. Mean size (nm) was determined based on size distribution in volume.

### 2.3. Preparation and characterization of AmB-GCPQ particles

**Preparation.** AmB was dissolved at a concentration of 4 mg mL<sup>-1</sup> in sodium hydroxide (0.02 N) at pH 12 in order to obtain a clear orange solution. Addition of GCPQ24 (20 mg mL<sup>-1</sup>) to the above solution resulted in a yellow clear suspension (pH 5). The AmB-GCPQ24 suspension was centrifuged for 30 min at 13000 rpm (MSE Microcentaur) and the supernatant was collected. The AmB-GCPQ24 formulation was diluted with deionized water in order to achieve a final AmB concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup>.

**Isocratic HPLC Quantification of AmB.** AmB formulation was further diluted in methanol (to 1 µg mL<sup>-1</sup>) before HPLC analysis. A validated analytical method utilising an Agilent 1200 series HPLC was used [42]. Briefly, AmB was isocratically eluted using a Thermo Hypersil BDS C18 reverse-phase column (200 × 4.6 mm, 5 µm) and a mobile phase consisted of an acetonitrile–acetic acid–water (52:4.3:43.7, v/v/v) with a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. Absorbance was monitored at 406 nm, and the injection volume was set at 40 µL. The retention time of AmB was 6.9 min and a linear regression calibration curve was obtained between 0.05 to 50 µg mL<sup>-1</sup> ( $y=12.424x+1.0095$ ;  $R^2=1$ ).

**PCS, FTIR and TEM.** Measurements were performed as previously described.

### 2.4. Pharmacokinetic studies in murine model

**Animals.** Male mice (4 - 5 week old, 19 – 25 g) were allocated in plastic cages in controlled laboratory animal conditions with ambient temperature and humidity maintained at ~ 22 °C and 60% with a 12 h light and dark cycle. Animals were acclimatized for 5 - 7 days prior to experiments, within the School of Pharmacy Animal House. Food and water were available *ad libitum*. All experiments were performed under a UK Home Office Animal License and in accordance with local ethics committee rules.

**Single dose oral administration of AmB formulations.** CD-1 mice were randomly split into groups of four and were fasted overnight previous AmB administration by oral gavage. Three different formulations of AmB were administered at the dose of 5 mg kg<sup>-1</sup> at the concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup>: (i) AmB-GCPQ24 (1:5 g g<sup>-1</sup>), (ii) simil Fungizone

(AmB:sodium deoxycholate, 1:0.82 g g<sup>-1</sup>) which was prepared as previously described [43] and (iii) AmB in 5% dextrose. Mice were sacrificed at different time points (0.5, 2, 4, 8, and 24 h) and blood and other organs (liver, spleen, brain, lungs, kidneys, bladder and gallbladder) were harvested. Plasma which was separated by centrifugation at 4500 rpm, 15 min at 4 °C and all tissues were stored at – 20 °C until analyses was performed.

**Multiple dose oral administration of AmB-GCPQ24 formulation.** CD-1 mice were randomly divided into two groups (n = 3): oral gavages of AmB-GCPQ24 (1:5 g g<sup>-1</sup>) were administered at the dose of 5 mg kg<sup>-1</sup> at the concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup> for 5 days either twice daily (Group A) or once a day (Group B). Mice were sacrificed either 12 h (Group A) or 24 h (Group B) following the last administration of AmB-GCPQ24. Blood and tissues (brain, liver, spleen, lungs, kidneys, bone marrow, bladder and gallbladder) were collected and stored as described above.

**Intravenous (iv) administration of AmB-GCPQ24 formulation.** Groups of three male balb/c mice were intravenously administered freshly filtered (0.2 µm) AmB-GCPQ24 formulation (1:5 g g<sup>-1</sup>) at the dose of 1 mg kg<sup>-1</sup>. The formulation was previously diluted to 0.25 mg mL<sup>-1</sup> with a mixture (1:1) of sodium chloride (0.9% w/v) and dextrose (5% w/v). At various time intervals, animals were killed (5 min, 30 min, 2 h, 4 h, 8 h, and 24 h) and blood was sampled. Plasma was separated and stored as described above.

**AmB extraction.** Plasma samples (100 µL) were spiked with meloxicam (Fagrón S.L., Madrid, Spain) as internal standard (IS) at a final concentration of 20 µg mL<sup>-1</sup>. Extraction was carried out with methanol (300 µL). After vortexing, the mixture was centrifuged (10000 rpm, 10 min) and the supernatant was evaporated under a stream of nitrogen. The samples were reconstituted with methanol (100 µL) and then were centrifuged (10000 rpm, 5 min). The supernatants were analysed by the isocratic HPLC method previously described.

Tissue samples (brain, liver, spleen, lungs, kidneys and bone marrow) were spiked with meloxicam as previously described for plasma samples. Then, AmB was extracted with a sodium hydroxide (0.02 N) solution at pH 12. Different ratios (tissue: sodium hydroxide solution, g mL<sup>-1</sup>) were used depending on the tissue which was extracted (1:2 for brain and liver, 1:4 for kidneys, 1:10 for lungs, spleen and bone marrow). Two extractions were carried out with methanol (2 mL x 2). In every extraction, the mixture was vortexed and then centrifuged (9000 rpm, 20 min, 4°C). The supernatant (2 mL x 2) was collected and then evaporated under a stream of nitrogen. The samples were

reconstituted with 200  $\mu\text{L}$  of a mixture 1:1 consisted of methanol:mobile phase (acetonitrile–acetic acid–water (52:4.3:43.7, v/v/v)). Once again, the reconstituted sample was centrifuged (13000 rpm, 5 min) prior to injection in the HPLC. A gradient HPLC method was developed in order to obtain a better separation between the AmB peak and other peaks from the biological samples (liver, spleen, kidneys, lungs, bone marrow, brain, urine and bile). However, plasma samples were analysed by the isocratic HPLC method because AmB peak exhibited a good resolution and it is a faster method than gradient analysis.

Urine was obtained after centrifuging bladder samples at 13000 rpm for 5 min. Urine samples (10  $\mu\text{L}$ ) were spiked with meloxicam (10  $\mu\text{L}$ ) and then it was added 80  $\mu\text{L}$  of methanol. Similarly, bile samples were analyzed (gallbladder samples were spiked with 10  $\mu\text{L}$  of meloxicam and then 100  $\mu\text{L}$  of methanol was added). After vortexing, samples were centrifuged (13000 rpm, 10 min) and the supernatants were analyzed by a gradient HPLC method.

**Gradient HPLC Quantification of AmB.** An HPLC gradient method utilising an Agilent 1200 series HPLC was developed to analyse tissue samples. The samples (40  $\mu\text{L}$ ) were injected through a Thermo Hypersil BDS C18 reverse-phase column (200  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) maintained at 40°C, at a flow rate of 1.2 mL min<sup>-1</sup>. The mobile phase was consisted of 0.02 % trifluoroacetic acid in water (line A) and acetonitrile (line B). The gradient method expressed as time (min): line B (%) was the following one: 0:10, 5:10, 15:59, 22:66, 28:90, 33:10. Amphotericin B and meloxicam were detected at a wavelength of 406 nm and had a retention time of 16.0 and 16.6 min respectively. AmB concentrations were calculated from linear regression calibration curves from peak height ratio AmB/IS.

## **2.5. Oral pharmacokinetic studies in beagles**

**Animals.** Animals were housed according to the standards of the committee of animal Welfare, fed daily, and allowed free access to water throughout the study. Animal group was consisted of four male (weight between 15 to 19 kg) and one female (15 kg) healthy beagles approximately 4 years of age. All experiments were approved and performed in accordance with local ethics committee rules (University Cardenal Herrera-CEU, Valencia, Spain).

**Single dose oral administration of AmB formulations.** Beagles were randomly assigned to receive orally either AmB-GCPQ24 formulation (n=3) or AmBisome<sup>®</sup> (n=2) at 4 mg kg<sup>-1</sup> of body weight. Prior to administration, AmBisome<sup>®</sup> was reconstituted with 5% glucose at a final concentration of 4 mg mL<sup>-1</sup>. AMB-GCPQ24 was prepared as previously described at a final AmB concentration of 4 mg mL<sup>-1</sup>. After oral administration, blood sampling was carried out at the following time points: time zero (predose), 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h and 48 h. Plasma was separated by centrifugation and then stored at -20 °C until assayed.

**Extraction of AmB.** Plasma samples (250 µL) were spiked with meloxicam at a final concentration of 10 µg mL<sup>-1</sup>. Two extractions were carried out with methanol (750 µL x 2) and at third one with acetonitrile (750 µL). After every extraction, the mixture was vortexed and centrifuged at 9000 rpm, 10 min, 4°C. The supernatants collected (750 µL x 3) were evaporated off in a concentrator (Savant, SpeedVac<sup>®</sup>) at 30°C. Samples were reconstituted with 250 µL of a mixture 1:1 consisted of methanol:mobile phase (acetonitrile–acetic acid–water (52:4.3:43.7, v/v/v)). The reconstituted samples were centrifuged (9000 rpm, 5 min) and then the supernatants were analysed by the isocratic HPLC method previously described.

## 2.6. Animal infection model and anti-leishmanial in vivo assay

**Animals.** Balb/c male inbred mice of 6-8 weeks of age were purchased from Harlan Iberica S.A. (Barcelona, Spain) and were allocated according to the standards of the committee of animal Welfare in plastic cages in the House Unit of the Complutense University in controlled laboratory animal conditions (22 °C ambient temperature, 60% humidity and 12 h light and dark cycle). Food and water were available *ad libitum*. All experiments were approved by the Complutense University Institutional Animal Care and Ethics Committee.

**Preparation of *Leishmania infantum* parasites for experimental infection.** The preparation of the parasites and the experimental infection were performed as previously described [44]. Briefly, *L. infantum* amastigotes (CNB150) were harvested from spleens of infected hamsters and cultured in NNN medium supplemented with penicillin (200 IU) and streptomycin (2 mg mL<sup>-1</sup>) for 2 days up to the time of transformation into promastigotes. Afterwards, they were transferred to C-199 medium supplemented with 10 mM adenine (1%) in 50 mM Hepes, 0.25% hemin in 50%

triethanolamine, 0.348 g/ L<sup>-1</sup> sodium bicarbonate, 25 mM Hepes, 20% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS), 100 µg mL<sup>-1</sup> penicillin and 100 µg mL<sup>-1</sup> streptomycin, at pH 7.2. Under these conditions, the resistance to complement lysis was determined to quantify the maximum number of metacyclic forms which was achieved at day 7. After 7 days (stationary phase), from the primary culture, promastigotes were harvested by centrifugation (2000 x g for 15 min). Finally, they were washed with phosphate buffer saline (PBS) at pH 7.2 and then resuspended in PBS. Promastigotes were counted using a Neubauer haemocytometer to provide the appropriate number of promastigotes per inoculum. Each mouse was infected with 10<sup>7</sup> promastigotes by intracardiac route.

**Anti-Leishmania *in vivo* assay.** Balb/c mice (20-25 g) were randomly split into five groups of eight animals. Treatment was started on day 24 post-infection. Group A received intraperitoneal AmBisome<sup>®</sup> at a single dose of 5 mg kg<sup>-1</sup> body weight. Prior to administration, AmBisome<sup>®</sup> was reconstituted with water for injection up to 4 mg mL<sup>-1</sup> and then further diluted with glucose 5% administering a final volume of 0.2 mL. Group B received orally using oral catheters AmB:GCPQ24 formulation (AmB:GCPQ24, 1:5) at 5 mg kg<sup>-1</sup> body weight daily for five consecutive days. Group C was kept as untreated control for groups A and B. Group D was treated orally with the same formulation as group B (AmB-GCPQ24) at 5 mg kg<sup>-1</sup> body weight daily for ten consecutive days. Group E was kept as untreated control for group D. Animals were sacrificed on day 31 (groups A, B and C) or day 36 (groups D and E) post- infection. Several minutes before animals were killed, blood samples were obtained to quantify AmB levels. Spleen and liver from each animal were aseptically removed and weighted to quantify the parasite burdens while kidneys were harvested to assess the accumulation of AmB in this tissue. Plasma was separated by centrifugation and then both plasma and kidneys were stored at -20 °C until assayed.

**Estimation of parasite burden.** Estimation of parasite burden was quantified by the limit dilution assay as described previously [45, 46]. Briefly, spleen and liver were homogenised in cold PBS-glucose-EDTA solution using a steel stainless tissue grinder. Cell debris was removed by passage through a glass wool column. The suspension obtained was centrifuged at 2000 g for 15 min at 4°C. Afterwards, the supernatants were discarded and the pellets were collected and resuspended in C-199 medium supplemented as described above and then 200 µL of this suspension were transferred to the first well of a 96-well microtiter plate containing NNN medium supplemented with antibiotics. Serial dilutions were repeated transferring 100 µL from the previous well to

the next one and adding 100  $\mu$ L of C-199 medium. After incubation at 28°C for 7 days, the plates were read, considering as one parasite cell, the last dilution at which mobile promastigotes could be detected. The percentage of suppression of parasite replication (PS) was calculated using the following equation modified from Manandhar et al. [47]:

$$PS = (PC - PT) / PC \times 100 \quad (\text{Equation 1});$$

where PC is the number of parasites in the control group per tissue weight (g) and PT is the number of parasites after treatment per tissue weight (g).

**Quantification of AmB levels.** Plasma and kidney samples were analysed as described above to quantify the levels of AmB in order to establish a PKPD correlation.

## 2.7. Statistical analysis

Statistical analysis were performed via one-way ANOVA Test using Minitab 15 (Minitab Ltd, Coventry, UK) followed by Tukey's test considering p-values < 0.05 as statistical significant difference.

## 3. Results

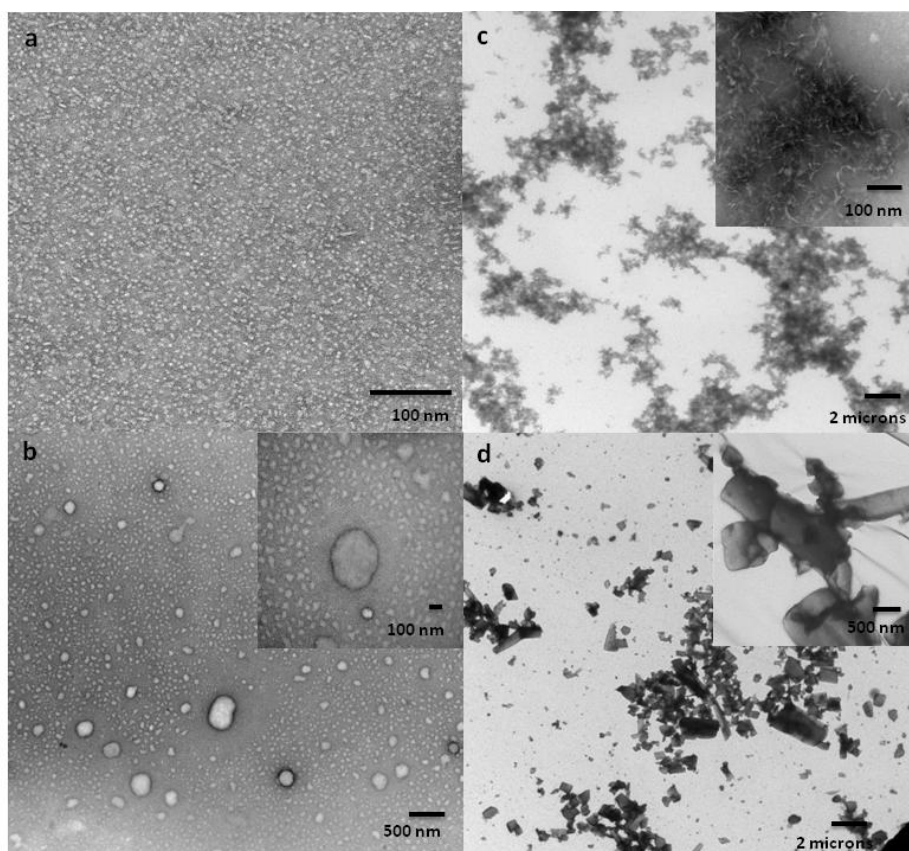
### 3.1. Polymer synthesis and characterization

The degraded GC24 was obtained in a yield of 51.4% and was characterised by a  $M_w = 7,783$  Da,  $M_n = 6,417$  Da,  $M_w/M_n = 1.213$ ,  $dn/dc = 0.1433 \pm 0.0011 \text{ mL g}^{-1}$ . The final polymer GCPQ24 was obtained in 48.6% yield characterised by a  $M_w = 9,955$  Da,  $M_n = 9,135$  Da,  $M_w/M_n = 1.090$ ,  $dn/dc = 0.1355 \pm 0.0028 \text{ mL g}^{-1}$ , 16.9 mol % palmitoylation and 16.5 mol % quaternary ammonium groups. The Hydrophobicity Index (HI) was 1.02 calculated based on the ratio between palmitoylation (mole %) and quaternary ammonium groups (% mole).

GCPQ24 self-assemblies in aqueous environment resulting in the formation of polymeric micelles with a particle size between 5 – 20 nm in diameter (Figure 1a). The FTIR spectrum of GCPQ is shown in figure 2. It was characterised by bands ( $\text{cm}^{-1}$ ) at: 3360 (N-H stretch, O-H stretch); 2923 and 2855 ( $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_3$  stretch); 1741 ( $\text{C}=\text{O}$  ester stretch); 1650 ( $\text{C}=\text{O}$  amide stretch); 1552 (N-H amide bend); 1474 ( $-\text{CH}_2$  bend); 1408 ( $-\text{CH}$  bend); 1381 ( $-\text{CH}_3$  bend); 1320 (C-O bend); 1239 (C-N stretch) and 1045 (C-O-C stretch, pyranose ring).

### 3.2. AmB-GCPQ nanoparticles

Our technique to produce AmB polymeric nanoparticles was based on a two-step strategy. Firstly, AmB was solubilised through the formation of carboxylate salts which were formed in alkaline aqueous media (NaOH 0.02 N). At this NaOH concentration, the pH was 12.2. AmB solubility is increased at alkaline pH [8]. AmB molecules aggregate in water at physiological pH 6-7 (as well as in 5% dextrose) forming polyhedric crystals which are very difficult to solubilise (Figure 1d).



**Figure 1.** TEMs with negative staining of AmB and GCPQ24 formulations. (a) GCPQ24 micelles ( $40 \text{ mg mL}^{-1}$ ) in desionized water. Micelles are 5-20 nm in diameter. (b) AmB ( $8 \text{ mg mL}^{-1}$ )-GCPQ24 ( $40 \text{ mg mL}^{-1}$ ) nanoparticles in desionized water. (c) Simil Fungizone diluted with desionized water to  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . (d) AmB crystals ( $8 \text{ mg mL}^{-1}$ ) in dextrose (5%, w/v). Crystals are 0.5. –  $2 \mu\text{m}$  in lenght.

Secondly, once AmB was solubilised, GCPQ was added to the formulation. AmB-GCPQ formulation exhibited a yellowish transparent appearance and revealed three populations with different particle size: 25.2, 170.5 and 5610 nm (Table 1). After the incorporation of the GCPQ, the formulation was centrifuged to remove any aggregated polymer and undissolved drug. After centrifugation, the AmB content was quantified by HPLC resulting in levels above 90% of the initial concentration. No AmB crystal was observed by TEM (Figure 1b). The particle size was reduced remaining two populations

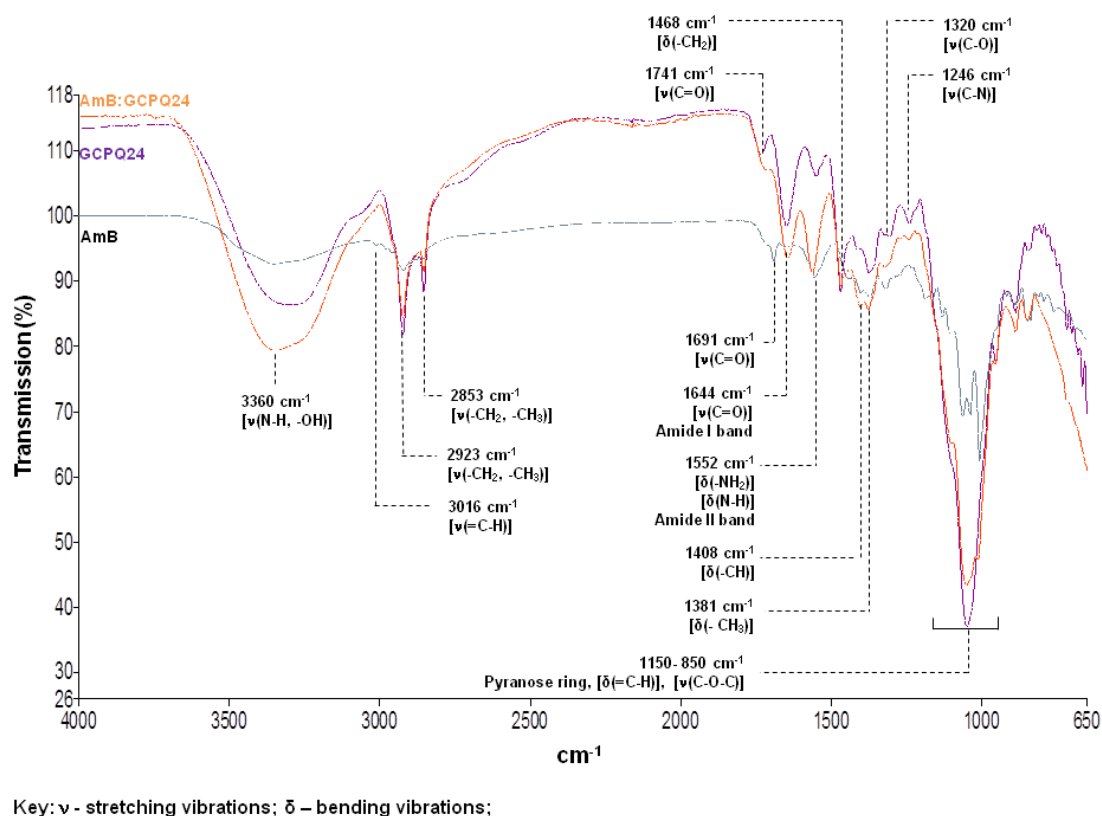
of 216 and 34.7 nm (Table 1). The hydrophobicity index of the GCPQ seems to play an important role in the formation of solubilised AmB nanoparticles. Polymers with higher palmitoylation (> 25%) or lower quaternization (< 15%) were not able to solubilise completely the AmB resulting in formulations with translucent appearance with bigger particle size or aggregates above the micron.

**Table 1. Characterization of AmB formulations. Particle size is reported as volume distribution of the different populations and its corresponding percentage. Zeta potential values are reported as mean  $\pm$  SD.**

Formulation	Composition	Appearance	Size (nm - %)	Zeta potential (mV)
GCPQ	GCPQ (5 mg mL <sup>-1</sup> )	Transparent	16.7 nm – 98.4% >500 nm – 1.6%	+16.0 $\pm$ 0.98
AmB in dextrose 5%	AmB (1 mg mL <sup>-1</sup> )	Opaque yellow	1656 nm – 72.3% 438.9 nm – 27.7%	-39.5 $\pm$ 3.1
AmB-GCPQ before centrifugation	AmB (1 mg mL <sup>-1</sup> ) GCPQ (5 mg mL <sup>-1</sup> )	Transparent yellow	5610 nm – 4.7% 170.5 nm – 28.3% 25.2 nm – 67%	+3.0 $\pm$ 0.1
AmB-GCPQ after centrifugation	AmB (1 mg mL <sup>-1</sup> ) GCPQ (5 mg mL <sup>-1</sup> )	Transparent yellow	216 nm – 40.9% 34.7 nm – 59.6%	+3.0 $\pm$ 0.1
Simil Fungizone	AmB (1 mg mL <sup>-1</sup> ) Sodium deoxycholate (0.82 mg mL <sup>-1</sup> ) Dibasic sodium phosphate (0.02 mg mL <sup>-1</sup> ) Monobasic sodium phosphate (0.016 mg mL <sup>-1</sup> )	Translucent orange	759.9 nm – 96.2% 182.5 nm – 3.8%	-27.7 $\pm$ 5.8

FTIR spectrum of AmB raw material and AmB-GCPQ24 nanoparticles after freeze drying are shown in Figure 2. Similarly to Gagos et al. [48], the most representative bands (cm<sup>-1</sup>) in the AmB appear at: 3356 (N-H stretch, O-H stretch); 3016 (=C-H stretch); 2929 and 2859 (-CH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub> stretch); 1691 (C=O acid stretch); 1552 (N-H bend); 1408 (-CH bend); 1381 (-CH<sub>3</sub> bend); 1319 (C-O bend); 1170 (C-O-C stretch); 1063 (C-O alcohol stretch); 1039 (C-O-C pyranose ring stretch) and 1005 (=C-H bend). Related to AmB-GCPQ24 formulation the most characteristic bands (cm<sup>-1</sup>) were found at: 3360 (N-H stretch, O-H stretch); 2923 and 2853 (-CH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub> stretch); 1726 (C=O ester stretch); 1644 (C=O amide stretch); 1552 (N-H bend); 1468 (-CH<sub>2</sub> bend); 1408 (-CH bend); 1381 (-CH<sub>3</sub> bend); 1320 (C-O bend); 1246 (C-N stretch) and 1045 (C-O-C stretch, pyranose ring).



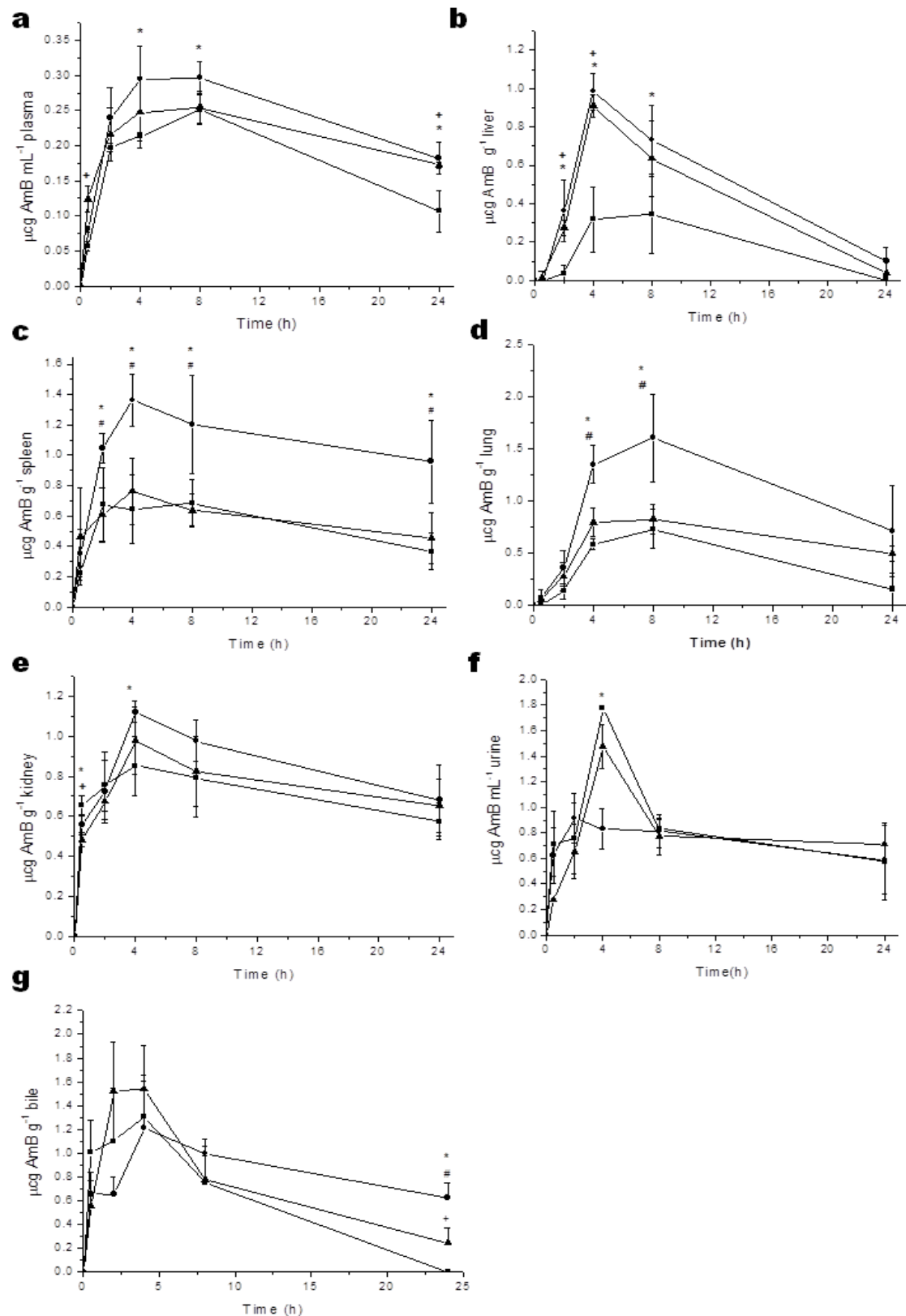


**Figure 2.** FTIR spectrum of AmB raw material, GCPQ24 and AmB-GCPQ24 nanoparticles after freeze drying.

### 3.3. Oral pharmacokinetic studies in murine model

The plasma and tissue concentration-time profiles of AmB-GCPQ24, simil Fungizone and AmB in dextrose following single oral administration are exhibited in Figure 3. The pharmacokinetic parameters determined from the concentration-time profiles are shown in Table 2. The results of tissue distribution following oral administration showed that the vast majority of the AmB was accumulated in liver, spleen and lungs (Figure 3b, 3c, 3d). Statistical significant differences were found in the AmB levels reached with the AmB-GCPQ24 formulation when compared to the drug alone (at 2, 4 and 8 h in liver; at 2, 4, 8 and 24 h in spleen; at 4 and 8 h in lungs) and the reference formulation Fungizone (at 2, 4, 8 and 24 h in spleen; at 4 and 8 h in lungs).

The AmB plasma exposure was increased with the AmB-GCPQ24 formulation compared to AmB in dextrose. The AmB accumulation (expressed as AUC values) achieved in other organs such as liver, spleen and lungs was greater compared to the drug alone (2.6, 2 and 2.5 fold respectively) and the reference formulation Fungizone (1.2, 1.9 and 1.7 fold respectively) (Table 2). The nanoparticulate formulation (AmB-GCPQ24) reached its maximum concentration level ( $C_{max}$ ) at 4 h in liver, kidneys and



**Figure 3.** Single dose oral administration of AmB formulations. AmB pharmacokinetics (mean  $\pm$ SD) after a single oral administration of AmB at 5 mg kg<sup>-1</sup> in CD-1 mice. The formulations administered were: AmB in dextrose (-■-), simil Fungizone (-▲-), and AmB (5 mg kg<sup>-1</sup>)- GCPQ24 (25 mg kg<sup>-1</sup>) formulation (-●-). (a) AmB plasma levels (µg mL<sup>-1</sup>). (b) AmB concentration in liver (µg

$\text{g}^{-1}$ ). (c) AmB concentration in spleen ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ). (d) AmB concentration in lungs ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ). (e) AmB concentration in kidneys ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ). (f) AmB concentration in urine ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). (g) AmB concentration in bile ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Statistical significant differences: \* =  $p < 0.05$  AmB-GCPQ24 versus AmB in dextrose; # =  $p < 0.05$  AmB-GCPQ24 versus simil Fungizone; + =  $p < 0.05$  AmB in dextrose versus simil Fungizone.

spleen and at 8 h in plasma and lungs. Fungizone exhibited similar  $t_{\text{max}}$  to AmB-GCPQ formulation. However, AmB in dextrose showed a  $t_{\text{max}}$  of 8 h in all the organs (plasma, liver, spleen and lungs) apart from kindeys where the  $C_{\text{max}}$  was reached at 4 h. It is an interesting point that AmB in dextrose exhibits higher affinity to the kidneys more than any other tissue. The mechanism of action of the AmB is based on its binding to sterols incorporated in cellular membranes [49]. This binding is more avid to the ergosterol (localised in fungal cells and parasites) than cholesterol which is localised in the mammalian cells resulting in AmB toxicity. The AmB accumulation in kidneys (which leads to nephrotoxicity) is related to the fact that the lysosomal membranes of renal tubular cells are cholesterol-rich [50]. As seen in Figure 3, GCPQ delivers the drug preferentially in other organs rather than kidney. The higher the ability to solubilise the AmB in the gastrointestinal tract (GIT), the higher the plasma  $C_{\text{max}}$  and the faster the onset of action reached with the different formulations. The percentage AmB dose recovered from tissues (liver, spleen, lungs, kidneys) and plasma at 8 hours after dosing AmB-GCPQ24 formulation was 2.3% which is 2-fold higher than the drug alone. The half-life ( $t_{1/2}$ ) of the AmB-GCPQ24 formulation was 61.3 h which can be explain by high tissue accumulation of AmB.

Levels in plasma increased slowly and sustained over a period of 8 hours after oral administration with all the formulations (Figure 3a). AmB was recovered from the gallbladder where it reached a maximum concentration at 4 hours following oral administration in all the formulations (Figure 3g). After 4 h, AmB levels in bile decreased which correlates with feeding times (animals were allowed to feed 4 h post-administration). The AmB accumulated in the bile over this period of time can be enterohepatically circulated into the GIT allowing for further absorption which it would prolong the AmB absorption over 8 h. The GCPQ enterohepatic circulation has been previously described by other authors. According to Lalatsa et al. [41], it has been shown that GCPQ nanoparticles are circulated from the villi to the portal circulation reaching the liver where it is secreted into the bile and then, presumably back to the

GIT. Apart from biliary clearance, AmB was excreted by the kidneys (Figure 3e). AmB concentration in kidneys was related to plasma levels. Minor differences were observed among the three formulations. Kidney levels were slightly higher with AmB-GCPQ24 formulation at 4 h when compared to AmB in dextrose but no differences were observed from Fungizone. Interestingly, AmB in dextrose exhibited the highest levels in kidneys 30 min after administration which it is probably indicating a faster renal elimination rate leading to lower accumulation in tissues. Similarly, both AmB in dextrose and Fungizone showed an AmB peak in urine at 2 hours after administration whereas AmB-GCPQ formulation displayed a more constant rate of AmB elimination through the urine.

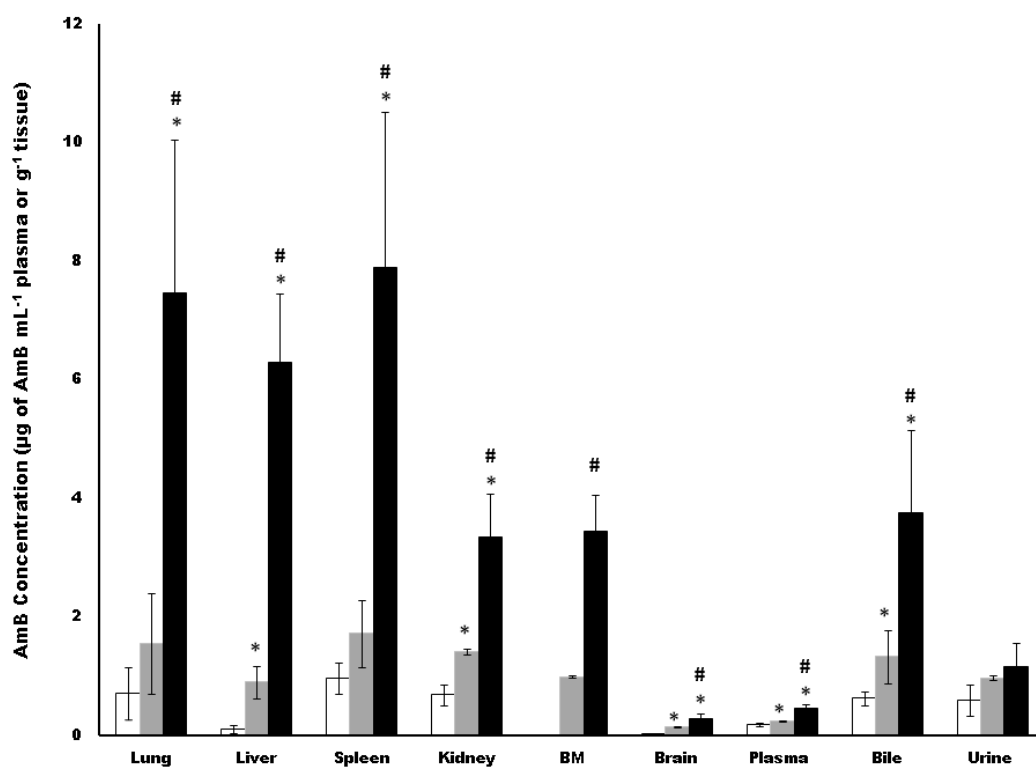
Bearing in mind that the major limiting factor of AMB is its nephrotoxicity, the ratio between the AmB concentration ( $C_{\max}$ ) in different organs (liver, spleen and lung) and AmB concentration in kidney was calculated to assess the risk-benefit ratio of the three formulations (Table 2).

**Table 2. Pharmacokinetic parameters following the oral administration of AmB formulations in CD-1 mice.  $C_{\max}$  values are expressed as mean  $\pm$  SD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$  or  $\mu\text{g g}^{-1}$ ).  $\text{AUC}_{0-24}$  values are expressed as  $\mu\text{g h mL}^{-1}$  for plasma and  $\mu\text{g h g}^{-1}$  for tissues. Mean Ratio values were calculated based on the ratio between the  $C_{\max}$  in the corresponding organs and the  $C_{\max}$  in kidneys. Key: NA- No applicable; BID – twice a day**

Formulation (Dose/ n° of days)	Collection of the samples	Plasma		Liver			Spleen			Lung			Kidney	
		$C_{\max}$	$\text{AUC}_{0-24}$	$C_{\max}$	$\text{AUC}_{0-24}$	Ratio Liver/ Kidney	$C_{\max}$	$\text{AUC}_{0-24}$	Ratio Spleen/ kidney	$C_{\max}$	$\text{AUC}_{0-24}$	Ratio Lung/ kidney	$C_{\max}$	$\text{AUC}_{0-24}$
<b>AmB- GCPQ24</b> (5 mg kg <sup>-1</sup> / single dose)	NA	0.308 $\pm$ 0.022	5.808	0.985 $\pm$ 0.095	11.718	0.880	1.364 $\pm$ 0.173	25.979	1.219	1.608 $\pm$ 0.423	26.535	1.437	1.119 $\pm$ 0.053	20.390
<b>Simil Fungizone</b> (5 mg kg <sup>-1</sup> / single dose)	NA	0.255 $\pm$ 0.023	5.169	0.908 $\pm$ 0.058	9.873	0.928	0.763 $\pm$ 0.221	13.826	0.780	0.827 $\pm$ 0.142	15.22	0.845	0.978 $\pm$ 0.168	18.041
<b>AmB in dextrose</b> (5 mg kg <sup>-1</sup> / single dose)	NA	0.251 $\pm$ 0.021	4.408	0.344 $\pm$ 0.201	4.459	0.404	0.686 $\pm$ 0.150	13.147	0.806	0.733 $\pm$ 0.185	10.5799	0.861	0.851 $\pm$ 0.149	17.014
<b>AmB- GCPQ24</b> (5 mg kg <sup>-1</sup> / once a day, for 5 days)	24 h after last dose	0.229 $\pm$ 0.010	NA	0.892 $\pm$ 0.272	NA	0.635	1.716 $\pm$ 0.563	NA	1.221	1.548 $\pm$ 0.844	NA	1.102	1.405 $\pm$ 0.054	NA
<b>AmB- GCPQ24</b> (5 mg kg <sup>-1</sup> / BID, for 5 days)	12 h after last dose	0.462 $\pm$ 0.051	NA	6.281 $\pm$ 1.175	NA	1.877	7.884 $\pm$ 2.621	NA	2.356	7.456 $\pm$ 2.584	NA	2.228	3.346 $\pm$ 0.725	NA

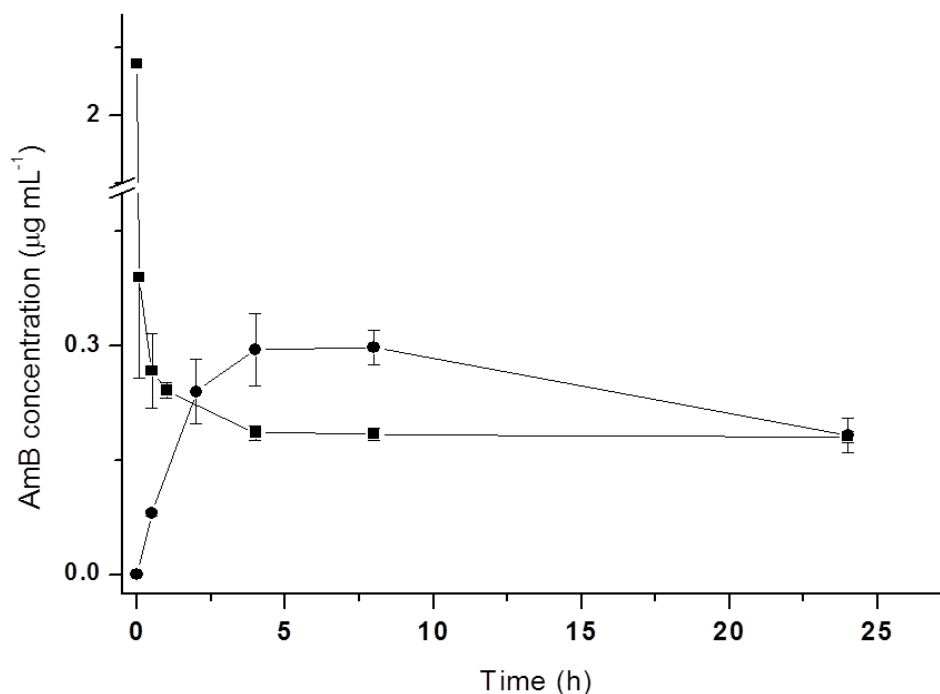
A positive risk-benefit ratio ( $>1$ ) was only achieved in spleen and lung with AmB-GCPQ24 formulation. As seen in Table 2, a more favourable ratio was obtained after following multiple administration of AmB-GCPQ24 formulation. This is especially important considering that an oral therapy with AmB would be based on multiple-dosing regimens more than single administration to achieve the desired effect.

The AmB tissue distribution in plasma and other multiple organs at 24 hours after single oral administration of AmB-GCPQ24 formulation (at  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) was compared to the AmB tissue concentration at 24 hours and 12 hours following the completion of once or twice-daily for 5 days oral treatment course of  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  of AmB-GCPQ24 formulation respectively (Figure 4). Similarly to the oral single dose administration, AmB does not remain in the plasma compartment and seems to be preferentially accumulated in other tissues.



**Figure 4. Multiple dose oral administration of AmB-GCPQ24. Comparison of AmB concentration in plasma and tissue distribution in multiple organs after single and multiple dose administration in CD-1 mice. AmB concentration at 24 hours after single oral administration of AmB-GCPQ24 formulation (at  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (white); AmB concentration at 24 hours following the completion of once daily for 5 days oral treatment course of  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  of AmB-GCPQ24 formulation (grey); AmB concentration at 12 hours following the completion of twice-daily for 5 days oral treatment course of  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  of AmB-GCPQ24 (black). AmB levels in bone marrow (BM) after single oral administration were not quantified. Statistical significant differences: \* =  $p < 0.05$  versus oral single dose administration and # =  $p < 0.05$  mutidose once-daily versus multidose twice-daily administration.**

Higher AmB levels were found in lungs, spleen and liver in comparison to kidneys which results in a more favourable risk-benefit ratio ( $> 1$ ). No statistical significant differences were found in the AmB excreted by urine. However, the bile clearance was incremented in both multidose regimens when compared to the oral single administration suggesting enterohepatic circulation is playing an important role in elimination. Interestingly, high levels of AmB were detected in the reticulo-endothelial system (RES) organs, not only in spleen, liver and lungs but also in bone marrow (0.98 and 3.44  $\mu\text{g}$  of AmB per g of tissue 24 or 12 hours after the last dose respectively). This is especially important as leishmania is an intracellular parasite found in RES cells and organs like spleen, liver and bone marrow [51]. In order to achieve complete elimination of the parasite, it is required that the drug is able to reach all the organs where the parasites are accumulating and reproducing. Other organs as brain seems to be more permeable to the AmB entrance after repeated doses (32 fold increment in the AmB concentration when compared AmB concentration 12 hours after administration of twice-daily 5  $\text{mg kg}^{-1}$  for 5 days to AmB concentration 24 h after single dose administration).

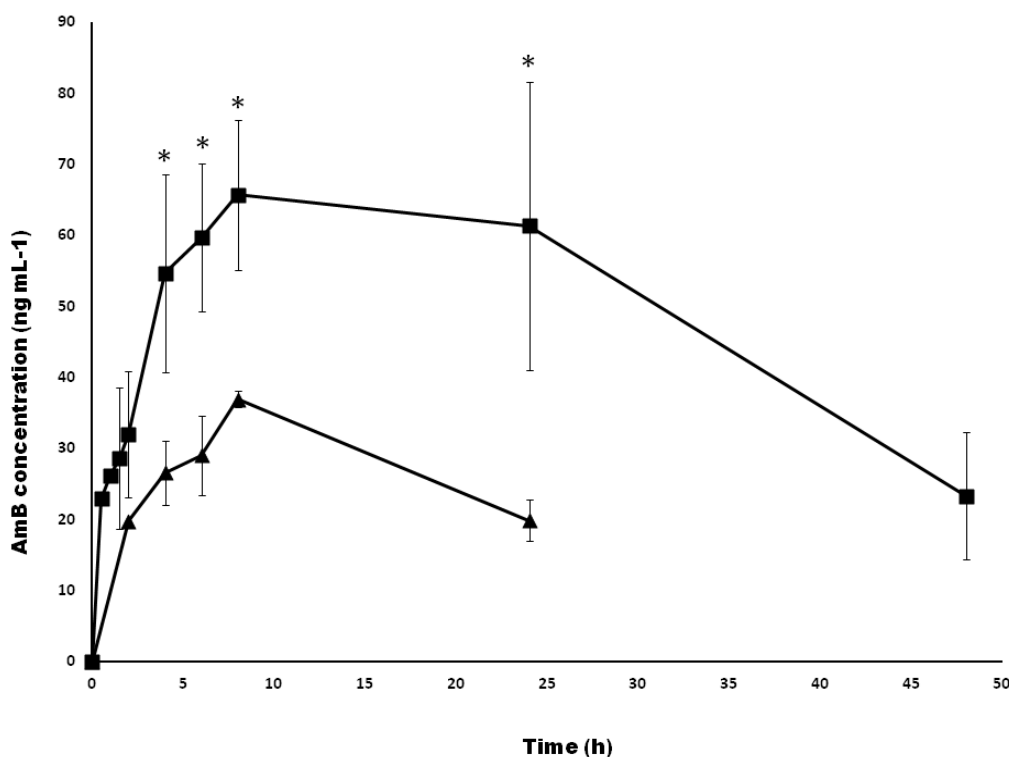


**Figure 5.** Oral bioavailability. Comparison of the AmB plasma concentration (mean  $\pm$ SD) versus time profile after oral (-●-) and iv (-■-) administration of AmB-GCPQ24 formulation at the dose of 5 and 1  $\text{mg kg}^{-1}$  respectively.

After the iv administration of AmB-GCPQ24 (Figure 5), a fast decline of the AmB plasma levels followed by a slower disappearance of the drug from the plasma compartment was observed related to increased tissue distribution as it has been previously reported by other authors [52, 53]. The  $AUC_{0-24}$  obtained after the iv administration of AmB-GCPQ24 at the dose of  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  was  $4.67 \mu\text{g h mL}^{-1}$ . Thus, the oral bioavailability of the AmB calculated as  $(AUC_{0-24} \text{ oral} \times \text{Dose iv} / AUC_{0-24} \text{ iv} \times \text{Dose oral})$  was 24.7%. Similar values of oral bioavailability have been reported for other GCPQ nanoparticles [41].

### 3.4. Oral pharmacokinetic studies in beagles

The plasma concentration- time profile of AmB-GCPQ24 formulation and AmBisome® following single oral administration at  $4 \text{ mg kg}^{-1}$  in beagles is shown in Figure 6.



**Figure 6.** Oral administration in beagles. Comparison of the AmB plasma concentration (mean  $\pm$ SD) versus time profile after a single oral administration of AmBisome® ( $4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (-▲-) and AmB ( $4 \text{ mg kg}^{-1}$ )- GCPQ24 ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ) formulation (-■-) in beagles. AmB plasma concentration at 48 hours after orally administered AmBisome® was below the quantification limit of the method ( $15 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Statistical significant differences: \* =  $p < 0.05$  AmB-GCPQ24 versus AmBisome®.

Similar to the oral pharmacokinetics in murine model, both formulations exhibited a sustained absorption of the AmB over a period of 8 hours ( $t_{\text{max}} = 8 \text{ h}$ ). AmB was detected in plasma up to 48 hours following oral single administration of AmB-GCPQ24 formulation unlike AmBisome® (up to 24 h). The  $C_{\text{max}}$  of  $65.7 \pm 10.5 \text{ ng mL}^{-1}$

reached after the oral administration of AmB-GCPQ24 formulation was 1.8 fold higher than orally administered AmBisome<sup>®</sup>. The AmB-GCPQ24 formulation exhibited a relative oral bioavailability (calculated as  $AUC_{0-24}$ ) of 216.3% as compared to AmBisome<sup>®</sup> and a plasma half-life ( $t_{1/2}$ ) of 59.2 hours which is similar to the half-life observed in mice. Although the AmB concentration was not quantified in other tissues, the long plasma half-life correlates well to high AmB distribution in tissues which explains why there is still AmB in plasma at 48 hours post-administration. No signs of gastrointestinal toxicity (vomiting or diarrhoea) or other signs of acute toxicity were observed during the experiment.

### 3.5. Antileishmania *in vivo* activity

The antileishmanial activity of orally administered AmB-GCPQ24 formulation in *L. infantum*-infected Balb/c mice is shown in Figure 7.

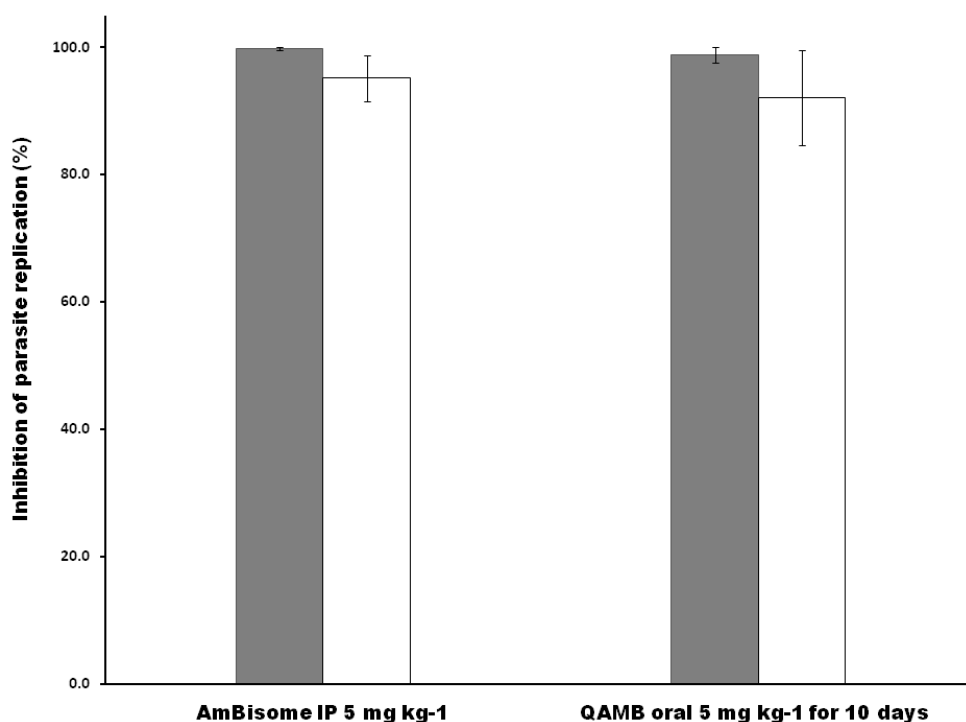


Figure 7. Antileishmanial activity of oral AmB-GCPQ24 formulation in *L. infantum*-infected Balb/c mice. Animals were infected and treated as described above. All treatments started 24 days post-infection. Groups of animals ( $n = 8$ ) received intraperitoneally AmBisome<sup>®</sup> at a single dose of 5 mg kg<sup>-1</sup> body weight or orally AmB-GCPQ24 formulation at 5 mg kg<sup>-1</sup> once-daily for 10 consecutive days. The parasitic burden was estimated by the limit dilution assay as previously described. The percentage of suppression of parasite replication (PS) in liver (grey) and spleen (white) was derived from the ratio of hepatic or splenic parasite burdens calculated as  $PS = (PC - PT) / PC \times 100$  where PC is the number of parasites in the control group per tissue weight (g) and PT is the number of parasites after treatment per tissue weight (g). Data are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical significant differences ( $p < 0.05$ ) were not found between both regimens.



AmBisome<sup>®</sup> is considered as the gold standard in the therapy of visceral leishmaniasis [6] and this is why it was used as a control in pharmacodynamic experiments. AmBisome<sup>®</sup> resulted in hepatic and splenic inhibition of parasite replication of  $99.8\% \pm 0.2\%$  and  $95.2\% \pm 3.6\%$  respectively when it was administered intraperitoneally a single dose of  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  body weight (Figure 7). AmB-GCPQ24 formulation exhibited a similar potency to AmBisome<sup>®</sup> when it was orally administered for 10 consecutive days at  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ , resulting in  $98.9\% \pm 1.2\%$  parasite inhibition in the liver and  $92.1\% \pm 7.5\%$  parasite inhibition in the spleen, which was not statistically different to AmBisome<sup>®</sup>. However, the administration of AmB-GCPQ24 formulation only for 5 consecutive days resulted not to be enough to reduce significantly the parasite replication compared to AmBisome<sup>®</sup> (data not shown).

In order to establish a PKPD correlation, AmB concentration in plasma was analysed in all the animals, but also AmB concentration in kidneys was determined as an indicator of toxicity. AmB plasma levels (expressed as mean  $\pm$  SD) after a single intraperitoneal dose of AmBisome<sup>®</sup> (at  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ), an oral dose of AmB-GCPQ24 (at  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  daily for 10 consecutive days) and an oral dose of AmB-GCPQ24 (at  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  daily for 5 consecutive days) were:  $66.6 \pm 22.9 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $53.5 \pm 15.9 \text{ ng mL}^{-1}$  and  $43.8 \pm 20.9 \text{ ng mL}^{-1}$  respectively. AmB concentration in the kidneys (expressed as mean  $\pm$  SD) after a single intraperitoneal dose of AmBisome<sup>®</sup> (at  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ), an oral dose of AmB-GCPQ24 (at  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  daily for 10 consecutive days) and an oral dose of AmB-GCPQ24 (at  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  daily for 5 consecutive days) were:  $1443.6 \pm 662.4 \text{ ng g}^{-1}$ ,  $578.9 \pm 156.1 \text{ ng g}^{-1}$  and  $331.2 \pm 101.1 \text{ ng g}^{-1}$  respectively. The higher the AmB plasma levels were, the higher the AmB concentration in kidneys was. Plasma levels are related to increased nephrotoxicity and are in equilibrium with levels of AmB in distributed tissues and RES organs, the latter being critical for antileishmanial activity. AmB-GCPQ24 plasma levels after 5 days of treatment were lower than after 10 days of oral administration which explains the lowest antileishmanial activity achieved by this regimen. However, the AmB kidney levels are related to a potential risk of nephrotoxicity; thus, the oral AmB-GCPQ24 formulation seems to be safer because of the lower AmB concentration in kidney compared to AmBisome<sup>®</sup>.

#### **4. Discussion**

The equilibrium between hydrophobic and hydrophilic forces is a critical parameter in the solubilisation of amphiphilic drugs such as AmB. Because of the required critical

percentage of quaternary ammonium groups to form the AmB-GCPQ nanoparticles, we hypothesised that the first interaction between AmB-GCPQ is based on an ionic complex formation between the quaternary ammonium groups of the GCPQ and the carboxylate groups of the AmB resulting in the release of NaCl and water to the media. Nevertheless, the hydrophobic interactions between the palmitic tails of the GCPQ and the conjugated doubled bonds of the AmB fuel the encapsulation of the drug into GCPQ nanoparticles. Areas with higher electron density can be observed as a darker ring around the nanoparticles (Figure 1 b) which seems to indicate that the charges are localised on the surface of the nanoparticles while the hydrophobic groups are oriented towards the core (whiter areas inside the nanoparticles).

The FTIR signal of the carboxylate groups of the AmB at  $1691\text{ cm}^{-1}$  disappear when AmB is formulated with GCPQ as well as the band correlated to C-N bond (quaternary ammonium group) in the GCPQ spectrum diminishes its intensity. The ionic interaction between both groups seems to be responsible for these changes in the FTIR spectra. Whereas, a covalent interaction between both groups does not seem to happen because the increase in the band at  $1552\text{ cm}^{-1}$  which seems to be related to the addition of the signals from the amine groups  $\delta(\text{-NH}_2)$  of the AmB and the amide band  $\delta(\text{N-H})$  of the GCPQ more than the formation of new covalent amide bond.

The single oral administration of AmB-GCPQ24 formulation enhanced the oral absorption of the drug when compared to the drug alone or the reference formulation Fungizone. As seen in Figure 1, the AmB in dextrose aggregates forming crystals which are presumably difficult to be dissolved during their transit along the GIT resulting in less oral absorption. On the contrary, oral bioavailability of AmB is greatly enhanced because of the encapsulation of AmB into GCPQ nanoparticles. Firstly, GCPQ enables AmB solubility in aqueous environments due to its amphiphilic nature and secondly, it improves AmB permeability (the passive diffusion of the AmB is very limited because of its molecular weight of 924 Da) due to its mucoadhesive properties and particle charge that promote its penetration through the mucus layer enabling the contact with between the AmB and the epithelium absorptive cells of the GIT. The particle size of the simil Fungizone formulation unlike AmB-GCPQ nanoparticles is larger and is consisted of two populations of 759.9 and 182.5 nm (representing the 96 and 4% respectively). Other difference between the Fungizone and AmB-GCPQ formulation is the particle charge (Table 1). The sodium deoxycholate used as an excipient in the

Fungizone forms particles with negative charge on their surface; on the contrary, the quaternary ammonium groups of the GCPQ enables the formation of positively charged particles. As previously described by other authors [54-57], both particle size and charge play a key role in the internalization of the particles into the epithelial cells of the GIT resulting more efficiently uptake those neutral or positively charged nanoparticles with a particle size below 500 nm. In our study, both parameters seem to be critical in order to achieve 24.7% AmB oral bioavailability. AmB-GCPQ24 formulation compared to oral AmB lipid-based formulations reported by other authors [23, 26, 58] is able to deliver higher amount of drug into the tissues (liver, spleen and lungs) after the oral administration of the same dose of AmB and at the same time of analysis.

The high peak concentration reached at 4 h in the liver seems to be related to the oral absorption through the portal venous system. Once the absorbed fraction of nanoparticles has reached the liver through the portal venous system, they will be distributed to other organs. However, the high peak level reached in the spleen before 4 h may be related to a secondary absorption route through the lymphatic transport. GCPQ nanoparticles may enter in the lymphatic vessels through the M cells in the Peyer's patches and the isolated follicles of the gut-associated lymphoid tissue. From the lymphatic vessels, the nanoparticles would be transported through the lymph nodes to the blood stream avoiding the hepatic first-pass metabolism. In the lymphatic fluid, the nanoparticles considered as foreign particulate agents, would be removed through phagocytosis by the macrophages which can migrate to different tissues such as liver, spleen, lungs or bone marrow [59]. As it has been previously described, AmB can be opsonised and cleared by the macrophages of the RES [8], which would explain the high levels of AmB found in the organs of the RES (spleen, liver, lungs and bone marrow). Because of the low drug levels detected in plasma, it seems that the organs of the RES act as a reservoir for the drug from where is slowly released to plasma and then, excreted by urine and bile. This supposes a great advantage in the treatment of different diseases such as leishmaniasis because the drug is accumulated at the same location as the parasites, which explains why the AmB-GCPQ24 formulation after oral administration exhibited similar potency to AmBisome<sup>®</sup> against leishmania parasites. In addition, the AmB levels found after multiple dose oral administration in lungs and brain (above the MIC reported by several authors [60-63]) suggests that the oral therapy of AmB could be successful for the treatment of many other infective diseases apart

from leishmaniasis, such as aspergillosis or central nervous system fungal infections. Nevertheless, pharmacodynamic studies should be carried out to confirm this hypothesis.

This is the first report about the oral absorption of AmB in dogs. We have shown that the AmB-GCPQ24 formulation enables the oral absorption of AmB not only in rodents but also in other mammalian species like dog. Interspecies scaling is necessary to predict pharmacokinetic parameters in humans and then, AmB-GCPQ24 formulation seems to be a good candidate for the development of an oral AmB therapy. Several differences were found when it was compared the plasma concentration –time profile between dogs (Figure 6) and mice (Figure 3a). The  $C_{\max}$  value after oral single administration of AmB-GCPQ24 was lower in beagles than in mice. We hypothesize that this fact could be related to a combination of factors such as the stomach pH and the bile flow. The lower stomach pH in fasted dogs ( $\text{pH} = 2.03 \pm 0.59$ ) [64] compared to fasted mice ( $\text{pH} = 4.04 \pm 0.2$ ) [65] can be responsible for a faster degradation of the AmB in the stomach resulting in less drug available to be absorbed during its transit through the intestine. Regarding the biliary secretion patterns, dogs have a reduced bile flow ( $12 \text{ mL day}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ) [66] compared to mice ( $100 \text{ mL day}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ) [66] which can be related to a lower solubilisation of the drug in the intestine leading to less absorption. The effect on oral AmB absorption of the Peyer's patches could be another difference between mice and dogs. It has been reported a total of 26-39 Peyer's patches distributed along the entire small intestine in dogs and between 6-12 Peyer's patches in mice [65, 67]. There is a combination of enterocytes and M cells in the epithelium that covers the domes of the Peyer's patches [67] and then, the transport of the AmB across M cells and Peyer's patches into lymphatics may be increased in dogs resulting in higher accumulation in the macrophages of RES. Other difference observed between AmB pharmacokinetics was the faster decrease in AmB plasma concentration from 8 to 24 h in mice (38.8%) compared to dogs (6.7%). This fact can be related to the faster glomerular filtration rate in mice ( $14 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ) than in dogs ( $6 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ) [66].

## 5. Conclusions

To summarize, we have designed a nanomedicine from amphiphilic chitosan able to deliver orally AmB in enough concentration to elicit its pharmacological effect. AmB-GCPQ24 has an oral bioavailability of 24.7% reaching a high concentration of AmB in

the RES organs and cells. An oral therapy for 10 consecutive days at 5 mg kg<sup>-1</sup> of AmB-GCPQ24 exhibited a similar potency to AmBisome<sup>®</sup> against leishmania parasites in liver and spleen. The high activity linked with a low toxicity (lower AmB concentration in kidneys) results in an effective and safe oral therapy of AmB which it can expand the access for the treatment of visceral leishmaniasis especially in developing countries.

### **Acknowledgements**

David McCarthy (UCL School of Pharmacy) is acknowledged for providing transmission electron microscopy expertise. This work was financial supported by the UCL School of Pharmacy, University of London and the School of Pharmacy, Complutense University and Madrid Community Administration (research group 910939). D.R. Serrano is supported by a Research Fellowship FPU grant (AP2008-00235) from the Spanish Ministry of Education.

### **References**

- [1] R.D. Meyer, Current role of therapy with amphotericin B, *Clin Infect Dis*, 14 Suppl 1 (1992) S154-160.
- [2] J. Maertens, M. Vreboos, M. Boogaerts, Assessing risk factors for systemic fungal infections, *Eur J Cancer Care (Engl)*, 10 (2001) 56-62.
- [3] R. Das, Ranganathan R., An Overview of Changing Trends in Systemic Fungal Infections., *WebmedCentral MICROBIOLOGY*, 3 (2012) WMC003386.
- [4] U.K. Singh, R. Prasad, B.P. Jaiswal, P.K. Singh, C.P. Thakur, Amphotericin B therapy in children with visceral leishmaniasis: daily vs. alternate day, a randomized trial, *J Trop Pediatr*, 56 (2010) 321-324.
- [5] S. Arikan, J.H. Rex, Lipid-based antifungal agents: current status, *Curr Pharm Des*, 7 (2001) 393-415.
- [6] Medical-Letter, *Drugs for Parasitic Infections in*, The Medical Letter, Inc., New York, 2010, pp. 86.
- [7] D.F. Bes, N. Sberna, M.T. Rosanova, [Advantages and drawbacks of amphotericin formulations in children: literature review], *Arch Argent Pediatr*, 110 (2012) 46-51.
- [8] J.J. Torrado, R. Espada, M.P. Ballesteros, S. Torrado-Santiago, Amphotericin B formulations and drug targeting, *J Pharm Sci*, 97 (2008) 2405-2425.
- [9] J. Ben-Ari, Z. Samra, E. Nahum, I. Levy, S. Ashkenazi, T.M. Schonfeld, Oral amphotericin B for the prevention of *Candida* bloodstream infection in critically ill children, *Pediatr Crit Care Med*, 7 (2006) 115-118.
- [10] J. Torrado, D. Serrano, I. Uchebgu, The oral delivery of amphotericin B, *Therapeutic Delivery*, 4 (2013) 9-12.
- [11] H.M. Kravetz, V.T. Andriole, M.A. Huber, J.P. Utz, Oral administration of solubilized amphotericin B, *N Engl J Med*, 265 (1961) 183-184.
- [12] D.B. Louria, Some aspects of the absorption, distribution, and excretion of amphotericin B in man, *Antibiotic Med Clin Ther*, 5 (1958) 295-301.
- [13] C. Halde, V.D. Newcomer, E.T. Wright, T.H. Sternberg, An evaluation of amphotericin B in vitro and in vivo in mice against *Coccidioides immitis* and *Candida albicans*, and preliminary observations concerning the administration of amphotericin B to man, *J Invest Dermatol*, 28 (1957) 217-231; discussion, 231-212.
- [14] A. Florence, Siepmann J, *Modern Pharmaceutics: Basic Principles and Systems*, in: *Drugs and The Pharmaceutical Sciences*, Taylor & Francis, New York, 2009, pp. 500.
- [15] S. Kethireddy, D. Andes, CNS pharmacokinetics of antifungal agents, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 3 (2007) 573-581.
- [16] P.A. Patel, V.B. Patravale, AmbiOnp: solid lipid nanoparticles of amphotericin B for oral administration, *J Biomed Nanotechnol*, 7 (2011) 632-639.

- [17] P. Gershkovich, E.K. Wasan, M. Lin, O. Sivak, C.G. Leon, J.G. Clement, K.M. Wasan, Pharmacokinetics and biodistribution of amphotericin B in rats following oral administration in a novel lipid-based formulation, *J Antimicrob Chemother*, 64 (2009) 101-108.
- [18] V.K. Prajapati, K. Awasthi, T.P. Yadav, M. Rai, O.N. Srivastava, S. Sundar, An oral formulation of amphotericin B attached to functionalized carbon nanotubes is an effective treatment for experimental visceral leishmaniasis, *J Infect Dis*, 205 (2012) 333-336.
- [19] S. Jain, P.U. Valvi, N.K. Swarnakar, K. Thanki, Gelatin coated hybrid lipid nanoparticles for oral delivery of amphotericin B, *Mol Pharm*, 9 (2012) 2542-2553.
- [20] J.L. Italia, M.N. Kumar, K.C. Carter, Evaluating the potential of polyester nanoparticles for per oral delivery of amphotericin B in treating visceral leishmaniasis, *J Biomed Nanotechnol*, 8 (2012) 695-702.
- [21] F. Ibrahim, P. Gershkovich, O. Sivak, E.K. Wasan, K.M. Wasan, Assessment of novel oral lipid-based formulations of amphotericin B using an in vitro lipolysis model, *Eur J Pharm Sci*, 46 (2012) 323-328.
- [22] F. Ibrahim, P. Gershkovich, O. Sivak, E.K. Wasan, K.M. Wasan, Pharmacokinetics and tissue distribution of amphotericin B following oral administration of three lipid-based formulations to rats, *Drug Dev Ind Pharm*, (2012).
- [23] O. Sivak, P. Gershkovich, M. Lin, E.K. Wasan, J. Zhao, D. Owen, J.G. Clement, K.M. Wasan, Tropically stable novel oral lipid formulation of amphotericin B (iCo-010): biodistribution and toxicity in a mouse model, *Lipids Health Dis*, 10 (2011) 135.
- [24] C.G. Leon, J. Lee, K. Bartlett, P. Gershkovich, E.K. Wasan, J. Zhao, J.G. Clement, K.M. Wasan, In vitro cytotoxicity of two novel oral formulations of Amphotericin B (iCo-009 and iCo-010) against *Candida albicans*, human monocytic and kidney cell lines, *Lipids Health Dis*, 10 (2011) 144.
- [25] E.K. Wasan, P. Gershkovich, J. Zhao, X. Zhu, K. Werbovetz, R.R. Tidwell, J.G. Clement, S.J. Thornton, K.M. Wasan, A novel tropically stable oral amphotericin B formulation (iCo-010) exhibits efficacy against visceral Leishmaniasis in a murine model, *PLoS Negl Trop Dis*, 4 (2010) e913.
- [26] P. Gershkovich, O. Sivak, E.K. Wasan, A.B. Magil, D. Owen, J.G. Clement, K.M. Wasan, Biodistribution and tissue toxicity of amphotericin B in mice following multiple dose administration of a novel oral lipid-based formulation (iCo-009), *J Antimicrob Chemother*, 65 (2010) 2610-2613.
- [27] K.M. Wasan, E.K. Wasan, P. Gershkovich, X. Zhu, R.R. Tidwell, K.A. Werbovetz, J.G. Clement, S.J. Thornton, Highly effective oral amphotericin B formulation against murine visceral leishmaniasis, *J Infect Dis*, 200 (2009) 357-360.
- [28] E.K. Wasan, K. Bartlett, P. Gershkovich, O. Sivak, B. Banno, Z. Wong, J. Gagnon, B. Gates, C.G. Leon, K.M. Wasan, Development and characterization of oral lipid-based amphotericin B formulations with enhanced drug solubility, stability and antifungal activity in rats infected with *Aspergillus fumigatus* or *Candida albicans*, *Int J Pharm*, 372 (2009) 76-84.
- [29] S.J. Thornton, K.M. Wasan, The reformulation of amphotericin B for oral administration to treat systemic fungal infections and visceral leishmaniasis, *Expert Opin Drug Deliv*, 6 (2009) 271-284.
- [30] J.L. Italia, M.M. Yahya, D. Singh, M.N. Ravi Kumar, Biodegradable nanoparticles improve oral bioavailability of amphotericin B and show reduced nephrotoxicity compared to intravenous Fungizone, *Pharm Res*, 26 (2009) 1324-1331.
- [31] K. Sachs-Barrable, S.D. Lee, E.K. Wasan, S.J. Thornton, K.M. Wasan, Enhancing drug absorption using lipids: a case study presenting the development and pharmacological evaluation of a novel lipid-based oral amphotericin B formulation for the treatment of systemic fungal infections, *Adv Drug Deliv Rev*, 60 (2008) 692-701.
- [32] V. Risovic, M. Rosland, O. Sivak, K.M. Wasan, K. Bartlett, Assessing the antifungal activity of a new oral lipid-based amphotericin B formulation following administration to rats infected with *Aspergillus fumigatus*, *Drug Dev Ind Pharm*, 33 (2007) 703-707.
- [33] R. Santangelo, P. Paderu, G. Delmas, Z.W. Chen, R. Mannino, L. Zarif, D.S. Perlin, Efficacy of oral cochleate-amphotericin B in a mouse model of systemic candidiasis, *Antimicrob Agents Chemother*, 44 (2000) 2356-2360.
- [34] J.S. Dangi, S.P. Vyas, V.K. Dixit, Effect of various lipid-bile salt mixed micelles on the intestinal absorption of amphotericin-B in rat, *Drug Dev Ind Pharm*, 24 (1998) 631-635.
- [35] WHO, Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, in: E.C.o.t.C.o. Leishmaniasis (Ed.) WHO technical report series, Geneva, , 2010.
- [36] A. Siew, H. Le, M. Thiovolet, P. Gellert, A. Schatzlein, I. Uchegbu, Enhanced oral absorption of hydrophobic and hydrophilic drugs using quaternary ammonium palmitoyl glycol chitosan nanoparticles, *Mol Pharm*, 9 (2012) 14-28.
- [37] A. Lalatsa, V. Lee, J.P. Malkinson, M. Zloh, A.G. Schatzlein, I.F. Uchegbu, A prodrug nanoparticle approach for the oral delivery of a hydrophilic peptide, leucine(5)-enkephalin, to the brain, *Mol Pharm*, 9 (2012) 1665-1680.

- [38] WHO, Initiative for Vaccine Research (IVR) in, 2012.
- [39] X. Qu, V.V. Khutoryanskiy, A. Stewart, S. Rahman, B. Papahadjopoulos-Sternberg, C. Dufes, D. McCarthy, C.G. Wilson, R. Lyons, K.C. Carter, A. Schatzlein, I.F. Uchegbu, Carbohydrate-based micelle clusters which enhance hydrophobic drug bioavailability by up to 1 order of magnitude, *Biomacromolecules*, 7 (2006) 3452-3459.
- [40] I.F. Uchegbu, L. Sadiq, M. Arastoo, A.I. Gray, W. Wang, R.D. Waigh, A.G. Schatzlein, Quaternary ammonium palmitoyl glycol chitosan--a new polysoap for drug delivery, *Int J Pharm*, 224 (2001) 185-199.
- [41] A. Lalatsa, N.L. Garrett, T. Ferrarelli, J. Moger, A.G. Schatzlein, I.F. Uchegbu, Delivery of peptides to the blood and brain after oral uptake of quaternary ammonium palmitoyl glycol chitosan nanoparticles, *Mol Pharm*, 9 (2012) 1764-1774.
- [42] R. Espada, J.M. Josa, S. Valdespina, M.A. Dea, M.P. Ballesteros, J.M. Alunda, J.J. Torrado, HPLC assay for determination of amphotericin B in biological samples, *Biomedical chromatography : BMC*, 22 (2008) 402-407.
- [43] R. Espada, S. Valdespina, C. Alfonso, G. Rivas, M.P. Ballesteros, J.J. Torrado, Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations, *International journal of pharmaceutics*, 361 (2008) 64-69.
- [44] M.A. Dea-Ayuela, E. Castillo, M. Gonzalez-Alvarez, C. Vega, M. Rolon, F. Bolas-Fernandez, J. Borrás, M.E. Gonzalez-Rosende, In vivo and in vitro anti-leishmanial activities of 4-nitro-N-pyrimidin- and N-pyrazin-2-ylbenzenesulfonamides, and N2-(4-nitrophenyl)-N1-propylglycinamide, *Bioorg Med Chem*, 17 (2009) 7449-7456.
- [45] J.O. Hill, R.J. North, F.M. Collins, Advantages of measuring changes in the number of viable parasites in murine models of experimental cutaneous leishmaniasis, *Infect Immun*, 39 (1983) 1087-1094.
- [46] R.G. Titus, M. Marchand, T. Boon, J.A. Louis, A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania* major in tissues of infected mice, *Parasite Immunol*, 7 (1985) 545-555.
- [47] K.D. Manandhar, T.P. Yadav, V.K. Prajapati, S. Kumar, M. Rai, A. Dube, O.N. Srivastava, S. Sundar, Antileishmanial activity of nano-amphotericin B deoxycholate, *J Antimicrob Chemother*, 62 (2008) 376-380.
- [48] M. Gagos, M. Arczewska, Spectroscopic studies of molecular organization of antibiotic amphotericin B in monolayers and dipalmitoylphosphatidylcholine lipid multibilayers, *Biochimica et biophysica acta*, 1798 (2010) 2124-2130.
- [49] J. Brajtburg, W.G. Powderly, G.S. Kobayashi, G. Medoff, Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action, *Antimicrob Agents Chemother*, 34 (1990) 183-188.
- [50] B.K. Yoo, M.A. Jalil Miah, E.S. Lee, K. Han, Reduced renal toxicity of nanoparticulate amphotericin B micelles prepared with partially benzylated poly-L-aspartic acid, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 29 (2006) 1700-1705.
- [51] P.M. Kaye, M. Svensson, M. Ato, A. Maroof, R. Polley, S. Stager, S. Zubairi, C.R. Engwerda, The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis, *Immunol Rev*, 201 (2004) 239-253.
- [52] R. Bellmann, Clinical pharmacokinetics of systemically administered antimycotics, *Curr Clin Pharmacol*, 2 (2007) 37-58.
- [53] R.M. Fielding, A.W. Singer, L.H. Wang, S. Babbar, L.S. Guo, Relationship of pharmacokinetics and drug distribution in tissue to increased safety of amphotericin B colloidal dispersion in dogs, *Antimicrob Agents Ch*, 36 (1992) 299-307.
- [54] C. He, L. Yin, C. Tang, C. Yin, Size-dependent absorption mechanism of polymeric nanoparticles for oral delivery of protein drugs, *Biomaterials*, 33 (2012) 8569-8578.
- [55] M. Francis, M. Cristea, F. Winnik, Polymeric micelles for oral drug delivery: Why and how, *Pure Appl. Chem.*, 76 (2004) 1321-1335.
- [56] G.G. Liversidge, K.C. Cundy, Particle-Size Reduction for Improvement of Oral Bioavailability of Hydrophobic Drugs .1. Absolute Oral Bioavailability of Nanocrystalline Danazol in Beagle Dogs, *International Journal of Pharmaceutics*, 125 (1995) 91-97.
- [57] D.T. O'Hagan, The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery, *J Anat*, 189 ( Pt 3) (1996) 477-482.
- [58] V. Risovic, M. Boyd, E. Choo, K.M. Wasan, Effects of lipid-based oral formulations on plasma and tissue amphotericin B concentrations and renal toxicity in male rats, *Antimicrob Agents Ch*, 47 (2003) 3339-3342.
- [59] M. Li, K.T. Al-Jamal, K. Kostarelos, J. Reineke, Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoparticles, *ACS Nano*, 4 (2010) 6303-6317.
- [60] O. Kayser, Nanosuspensions for the formulation of aphidicolin to improve drug targeting effects against *Leishmania* infected macrophages, *International Journal of Pharmaceutics*, 196 (2000) 253-256.

- [61] K.D. Manandhar, T.P. Yadav, V.K. Prajapati, S. Kumar, M. Rai, A. Dube, O.N. Srivastava, S. Sundar, Antileishmanial activity of nano-amphotericin B deoxycholate, *J Antimicrob Chemoth*, 62 (2008) 376-380.
- [62] V. Yardley, S.L. Croft, Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis, *Antimicrob Agents Ch*, 41 (1997) 752-756.
- [63] V. Yardley, S.L. Croft, A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis, *Int J Antimicrob Ag*, 13 (2000) 243-248.
- [64] K. Sagawa, F. Li, R. Liese, S. Sutton, Fed and Fasted Gastric pH and Gastric Residence Time in Conscious Beagle Dogs, *J. Pharm. Sci.*, 98 (2009) 2494-2500.
- [65] E.L. McConnell, A.W. Basit, S. Murdan, Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 60 (2008) 63-70.
- [66] B. Davies, T. Morris, Physiological parameters in laboratory animals and humans, *Pharmaceutical research*, 10 (1993) 1093-1095.
- [67] T.T. Kararli, Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals, *Biopharmaceutics & drug disposition*, 16 (1995) 351-380.



## **Resumen de los objetivos y discusión de los resultados**

El objetivo de este trabajo ha consistido en desarrollar una formulación con el fin de mejorar la biodisponibilidad oral de la AmB para alcanzar concentraciones terapéuticas en los órganos diana y así poder tratar infecciones sistémicas. Para ello, es necesario incrementar la solubilidad de la AmB en los fluidos gastrointestinales y además mejorar la permeabilidad a través de la barrera gastrointestinal. Con este objetivo, se utilizó un derivado del chitosán (Quaternary Ammonium Palmitoyl Glycol Chitosan, GCPQ), con carácter anfifílico, debido al glicol chitosán y a la cadena de ácido palmítico y con carga positiva debido al grupo de amonio cuaternario introducido en la estructura. El potencial de este polímero a la hora de incrementar la absorción oral de fármacos poco solubles en medios acuosos, se debe no solamente a su capacidad solubilizante, sino también a sus propiedades mucoadhesivas que permiten prolongar el tiempo de contacto del fármaco con las células del epitelio intestinal favoreciendo la difusión pasiva a través de la barrera gastrointestinal.

Se obtuvieron nanopartículas poliméricas tras la interacción entre AmB y GCPQ. Para evaluar el potencial del polímero en la absorción oral del fármaco, se llevaron a cabo estudios farmacocinéticos para determinar la cantidad de AmB absorbida (comparando la formulación AmB:GCPQ frente a simil de Fungizona y AmB en dextrosa) y estudios farmacodinámicos (comparando la formulación AmB:GCPQ frente al AmBisome®) para determinar si las concentraciones alcanzadas tras la administración oral eran eficaces en un modelo murino de VL.

Los resultados obtenidos de este trabajo fueron los siguientes:

En primer lugar, se observó que tras la administración oral de una única dosis, el incremento de la concentración plasmática es relativamente lento y prolongado en el tiempo con valores de  $t_{max}$  en torno a las 8 h. Aunque, se alcanzaron mayores niveles de fármaco en plasma con la formulación AmB:GCPQ, la diferencia era mínima en comparación con las otras dos formulaciones. En cambio, al determinar la cantidad de fármaco acumulado en tejidos, se observó una diferencia significativa en los niveles de AmB alcanzados especialmente en hígado, bazo y pulmón con la formulación AmB:GCPQ respecto a las otras dos formulaciones. Los niveles de AmB encontrados en riñón se correlacionaban con los valores en plasma, existiendo mínimas diferencias entre las tres formulaciones. Cabe destacar que además de excreción renal, se observó

acumulación de AmB en la bilis, probablemente indicando aclaramiento biliar y por lo tanto circulación enterohepática del fármaco.

En segundo lugar, la administración de AmB:GCPQ por vía IV se caracterizó por presentar una rápida desaparición del plasma seguida de una lenta eliminación del organismo, probablemente relacionado con acumulación en tejidos. Al comparar la curva de concentraciones plasmáticas frente al tiempo tras la administración IV y VO, se obtuvo un valor de biodisponibilidad oral de 24,7%, que es similar a otros valores encontrados en la bibliografía usando el mismo polímero con otros fármacos poco solubles.

Con el fin de alcanzar concentraciones eficaces en los tejidos, la formulación AmB:GCPQ fue administrada en un régimen multidosis a 5 mg/kg una o dos veces al día durante cinco días. Se observó un ligero incremento en los niveles plasmáticos y una marcada acumulación de fármaco en órganos del SRE, no solamente en hígado, bazo y pulmón sino también en médula ósea, lo cual puede ser potencialmente útil para el tratamiento de la leishmaniasis.

Además de estudios farmacocinéticos en roedores, se comparó la biodisponibilidad oral en perros entre la formulación AmB:GCPQ y el AmBisome<sup>®</sup>. De manera similar al perfil farmacocinético en roedores, se observó un prolongado periodo de absorción coincidiendo el  $t_{max}$  a las 8h. Con la formulación AmB:GCPQ se detectaron niveles de AmB en plasma hasta 48 h tras una única administración de 4 mg/kg. La biodisponibilidad oral relativa de la formulación AmB:GCPQ fue 2.2 veces superior en comparación al AmBisome<sup>®</sup>. Cabe destacar que no se observó ningún síntoma de toxicidad aguda o gastrointestinal (tales como vómitos o diarrea) en ninguno de los beagles.

Una vez demostrado que la formulación AmB:GCPQ era capaz de incrementar la biodisponibilidad oral del fármaco, se llevaron a cabo estudios *in vivo* de eficacia en un modelo murino de VL. Se comparó la eficacia del AmBisome<sup>®</sup> (fármaco de elección en el tratamiento de la VL en humanos) administrado por vía parenteral con la formulación AmB:GCPQ administrada por vía oral a la dosis de 5 mg/kg durante 5 o 10 días. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición en la replicación de los parásitos (en hígado y en bazo) entre el AmBisome<sup>®</sup> y la formulación administrada

durante 10 días consecutivos. Sin embargo, se observó una menor eficacia en el grupo tratado solamente durante 5 días.

Con el fin de poder establecer una correlación farmacocinética-farmacodinámica, al finalizar el tratamiento se cuantificaron los niveles de AmB en plasma y riñón. La concentración de AmB tanto en plasma como en riñón fue mayor en los animales tratados con AmBisome<sup>®</sup>, seguido por la formulación de AmB:GCPQ administrada durante 10 días y por último, los niveles más bajos fueron encontrados en aquellos animales tratados con AmB:GCPQ durante 5 días. Por lo tanto, la AmB absorbida tras administrar la formulación AmB:GCPQ durante 5 días, parece ser insuficiente para alcanzar concentraciones eficaces en los órganos diana; sin embargo, la cantidad de fármaco absorbida tras administrar la formulación durante 10 días consecutivos es suficiente, ya que ha demostrado tener una eficacia similar a una dosis de AmBisome<sup>®</sup> administrado por vía parenteral, con la ventaja adicional de que las concentraciones de AmB a nivel renal son menores en comparación con las del AmBisome<sup>®</sup> y probablemente el riesgo de producir nefrotoxicidad es menor.



tamaño partícula anfotericina B poliagregados sistema de red de endotelio toxicidad hemolítica macrófagos *Leishmania* niasis AmB

## 4. Discusión final

AmB isome fungizona anfotericina B dimérica acumulación en hígado y bazo resultando ser costo efectiva y segura en frótotoxicidad biológica distribución prolongada en circulación plasmática amplio volumen de distribución tamaño de partícula anfotericina B poliagregados sistema de red de endotelio toxicidad hemolítica macrófagos *Leishmania* AmB Beagle ship potencia eficacia chitosán modificado baja solubilidad escasamente disponible por vía oral excipientes ciclodextrinas de soxicolato sódico amphotericin B canac



## **4. DISCUSIÓN FINAL**

El objetivo fundamental sobre el que se ha basado esta tesis doctoral ha sido el desarrollo de nuevas formulaciones parenterales y no parenterales de AmB que sean coste-efectivas y seguras para el tratamiento de infecciones fúngicas y parasitarias. Con esta finalidad se procedió en un primer lugar a desarrollar y caracterizar formulaciones parenterales de AmB poliagregada y encapsulada en microesferas de albúmina.

El estado de agregación y el tamaño de partícula de la formulación están íntimamente ligados, de manera que durante el proceso de agregación de la AmB en medio acuoso, se forman agregados de mayor tamaño, dando lugar a un tamaño medio de partícula de la AmB poliagregada muy superior al de la AmB en estado dimérico. Ambos parámetros juegan un papel clave tanto en la distribución como en la toxicidad del fármaco.

La AmB poliagregada resultó ser significativamente menos tóxica en términos de toxicidad hemolítica que la mayoría de las formulaciones que contenían AmB en estado dimérico, probablemente debido a que las partículas de mayor tamaño al presentar una menor superficie específica, el contacto con las membranas de los glóbulos rojos es menor, siendo por lo tanto menos hemolíticas. En efecto, en la primera publicación se acreditó que cuanto mayor es el tamaño de partícula de los agregados, menor es la toxicidad hemolítica. Sin embargo, al tratarse de formulaciones destinadas a la administración IV, el límite superior de tamaño de partícula queda condicionado a los 5  $\mu\text{m}$ , ya que tamaños superiores a los 5 – 6  $\mu\text{m}$  podrían bloquear los capilares sanguíneos de menor tamaño, pudiendo desencadenar embolia pulmonar en el paciente [285].

La AmB fue encapsulada en microesferas de albúmina por ser una proteína biocompatible y además porque la AmB presenta una gran avidez por esta proteína. La AmB encapsulada resultó ser menos hemolítica que la AmB sin encapsular, ya que la AmB al estar unida a la albúmina de las microesferas, posiblemente el contacto con los glóbulos rojos sea menor. Tal vez, debido al mayor tamaño de partícula de la AmB poliagregada, se libera más lentamente en comparación con la AmB dimérica, consiguiendo un mayor efecto protector cuando se encapsula AmB poliagregada. Una de las principales ventajas de la AmB poliagregada, tanto libre como encapsulada en

microesferas de albúmina, es su baja toxicidad hemolítica, siendo similar a la producida por el AmBisome<sup>®</sup>, AmB liposomal considerado como una de las formulaciones más seguras para administración IV.

El tamaño de los agregados además tiene un papel clave en la distribución del fármaco en el organismo tras la administración IV. Por lo general, partículas con un tamaño inferior a los 10 nm son rápidamente eliminadas por vía renal [286]. Esta puede ser una de las razones por las que la Fungizona<sup>®</sup> es la formulación más nefrotóxica, ya que al ser una dispersión micelar con un pequeño tamaño de partícula, podría ser más fácilmente filtrada por los riñones. Además debido a que las membranas de las células tubulares a nivel renal son ricas en colesterol, son más susceptibles a la toxicidad causada por la AmB [287]. Por lo general, partículas con un tamaño por debajo de los 100 nm y partículas esféricas (las cuales tienen mayor tendencia a circular por el centro del vaso sanguíneo reduciendo así las interacciones con las células endoteliales) pueden circular durante más tiempo en el torrente sanguíneo [288, 289], como es el caso de la AmB liposomal, caracterizada por presentar un amplio AUC y un mínimo Vd. Por el contrario, partículas administradas por vía IV con una superficie hidrofóbica y con un tamaño por encima de los 400 nm, aunque el mecanismo no está perfectamente elucidado, parece ser que tienen una mayor tendencia a ser reconocidas como componentes extraños para el organismo pudiendo ser opsonizadas por proteínas plasmáticas. La opsonización facilitaría una interacción inespecífica con los macrófagos, estimulando así la endocitosis de las partículas opsonizadas, siendo acumuladas en los órganos del SRE principalmente en hígado y bazo [64, 290].

La distribución de la AmB poliagregada tras su administración IV parece estar relacionada con un proceso de opsonización-endocitosis-acumulación en tejidos del SRE, ya que el perfil farmacocinético de la formulación está caracterizado por una rápida desaparición de sangre seguida de una lenta eliminación del organismo. La AmB poliagregada presenta una concentración plasmática después de la infusión muy inferior a la obtenida con el AmBisome<sup>®</sup>, sin embargo presenta un Vd y un tiempo medio de residencia en el organismo muy superior. Por esta razón, la AmB poliagregada puede resultar de gran utilidad a la hora de tratar enfermedades como la leishmaniasis, ya que el fármaco es vectorizado hacia los órganos donde los parásitos están acumulados en el organismo (interior de macrófagos especialmente en el hígado y bazo).



Junto a lo anterior, la administración de altas dosis de AmB poliagregada (10 mg/kg) fueron bien toleradas en los beagles, a pesar de ser 10 veces superior a las dosis habituales administradas de Fungizona® (1 mg/kg) y 2 veces superior a las de AmBisome® (5 mg/kg). Esto supone una gran ventaja en la práctica clínica, ya que se podría acumular mayor cantidad de fármaco en el organismo con una única dosis, reduciéndose el número de administraciones necesarias para erradicar la enfermedad, lo que comporta una disminución en los problemas adversos relacionados con la infusión del fármaco y una reducción en el tiempo de hospitalización del paciente y por lo tanto una minoración de los costes indirectos. En aquellos perros con leishmaniasis, se observó que las concentraciones plasmáticas eran mayores que en perros sanos, probablemente esté relacionado con una menor actividad fagocítica de los macrófagos y por lo tanto menor acumulación en bazo e hígado. Por esta razón, la administración de altas dosis de AmB podría ser necesaria para poder vectorizar cantidad suficiente de fármaco a los órganos diana.

La AmB poliagregada resultó ser más segura en comparación con el AmBisome® y la AmB encapsulada en microesferas de albúmina, ya que no se produjo ningún efecto adverso grave durante su administración como broncoespasmo o reacciones anafilácticas. Sin embargo, se observó una interacción entre la AmB poliagregada y el medicamento anestésico (medetomidina) que se administró antes de la infusión del fármaco, probablemente debido a un desplazamiento en la unión a las proteínas plasmáticas. Por esta razón, no sería recomendable la coadministración de AmB poliagregada con fármacos que tengan una alta unión a proteínas plasmáticas (por el sinergismo en los efectos adversos producidos por ambos fármacos) y en el caso de tener que administrar AmB a pacientes con tratamientos crónicos con fármacos que tengan una alta unión a proteínas plasmáticas (ej. anticoagulantes orales) la administración debería ser más lenta y extremando las precauciones.

Una de las ventajas de la AmB poliagregada encapsulada en microesferas de albúmina es que la AmB al estar unida a la albúmina de la formulación, no tiene que competir con otros fármacos por la unión a las proteínas plasmáticas del organismo y por lo tanto el riesgo de interacción con otros fármacos hidrófobos sería menor. Sin embargo, hay que prestar especial atención al tipo de albúmina empleada en la fabricación de las microesferas, ya que si no se utiliza una albúmina específica de la especie en la que se vaya a administrar, podría existir un mayor riesgo de reacciones anafilácticas,

especialmente en la segunda dosis de tratamiento, tras la sensibilización y producción de anticuerpos.

En definitiva, las formulaciones con AmB poliagregada podrían ser una alternativa al AmBisome® en el tratamiento de la VL, ya que han demostrado tener un buen perfil de seguridad y un adecuado perfil farmacocinético vectorizando el fármaco hasta los órganos diana. Esta terapia sería especialmente útil en los países con menos recursos económicos y también en el tratamiento de la leishmaniasis canina (donde en muchas ocasiones el factor limitante de la terapia con AmB es el coste del tratamiento próximo a los 300 - 700 €/día). El coste de la AmB poliagregada sería muy inferior al del AmBisome®, probablemente siendo más similar al de la Fungizona® ya que presenta una composición similar y el proceso de obtención es relativamente sencillo.

Después de finalizar el estudio de formulaciones de AmB de administración por vía parenteral, se consideró necesario desarrollar formulaciones de administración por vía ocular debido a la incidencia de infecciones oculares fúngicas y al vacío terapéutico existente en formulaciones adaptadas a esta vía, ya que por el momento no se conoce ninguna formulación comercializada de AmB para administración oftálmica. La administración IV de AmB suele ser efectiva para el tratamiento de infecciones oculares fúngicas, sin embargo, la nefrotoxicidad es el factor limitante. Por el contrario, la administración ocular de AmB, suele ser bien tolerada y debido a su carácter hidrófobo por lo general, presenta una penetración a través de la córnea aceptable. No obstante, su baja solubilidad acuosa incrementa el riesgo de que el fármaco precipite a la concentración en la que es necesaria administrarlo pudiendo producir problemas de irritación conjuntival. Hasta ahora, para tratar infecciones fúngicas oculares graves, se suele preparar en los servicios de farmacia hospitalaria y/o comunitaria un colirio de AmB a partir de Fungizona®. A pesar de que la Fungizona® es más tóxica que el AmBisome®, al administrarse por vía ocular, los efectos adversos tales como la nefrotoxicidad son mínimos, lo que lleva a utilizar preferentemente la Fungizona® en vez del AmBisome® por razones económicas (5.8 €/vial de Fungizona® frente a 141 €/vial de AmBisome®). Sin embargo, la Fungizona® es una formulación adaptada a la vía parenteral y tiene ciertas limitaciones a la hora de ser usada por vía ocular. Por ejemplo, su administración suele producir irritación local debido al excipiente que contiene (desoxicolato sódico) lo que reduce el cumplimiento terapéutico por parte del paciente. Además, según su ficha técnica, el tiempo máximo de almacenamiento de la

Fungizona<sup>®</sup> es de 7 días entre 2 y 8 °C o de 24 h a temperatura ambiente, entre otras razones porque no contienen ningún agente bacteriostático que impida la contaminación bacteriana. Teniendo en cuenta que el tratamiento de infecciones fúngicas oculares tales como la queratitis suele ser prolongado, durante al menos un mes, es necesario preparar formulaciones al paciente diariamente para prevenir contaminaciones bacterianas del colirio que pudieran complicar aún más la infección ocular. Por esta razón el coste del tratamiento se ve incrementado (5.8 € x 30 días = 174 €).

La elección de CD como excipiente para el desarrollo de una formulación a nivel ocular se debe en primer lugar a que su uso está autorizado para ser utilizado en formulaciones oftálmicas y en segundo lugar, a su capacidad para incrementar la solubilidad de fármacos poco solubles y reducir su degradación [291]. En particular, se seleccionó la  $\gamma$ -CD ya que presenta mejor solubilidad acuosa que la  $\alpha$  y  $\beta$ -CD, que es importante debido a la baja solubilidad de la AmB; además la  $\gamma$ -CD es la que presenta una cavidad interna con mayor diámetro, habida cuenta que es necesario para poder albergar moléculas de mayor tamaño como por ejemplo, la AmB con un peso molecular de 924 g/mol [201]. No menos importante es el hecho de que la  $\gamma$ -CD es una de las CD más seguras a nivel ocular, ya que además de ser una de las CD que presenta menor citotoxicidad en células epiteliales de córnea humana (inferior incluso al cloruro de benzalconio el cual se emplea en muchas formulaciones oftálmicas), se ha observado que soluciones acuosas con concentraciones elevadas de CD (45%) son bien toleradas a nivel ocular [292].

En la segunda publicación se ha puesto de manifiesto la capacidad de la  $\gamma$ -CD para solubilizar la AmB en forma monomérica e incrementar su estabilidad físicoquímica en medio acuoso (cuando la concentración utilizada de  $\gamma$ -CD es  $\leq 10\%$ ). De entre todas las formulaciones evaluadas, la formulación constituida por 0.1% AmB, 10%  $\gamma$ -CD y 0.005% Timerosal<sup>®</sup> y almacenada a temperatura ambiente es la que presenta las características más idóneas para ser utilizada en la práctica clínica como formulación oftálmica siendo estable durante al menos 30 días. Esta formulación es fácil de preparar por los servicios de farmacia hospitalaria y/o comunitaria, ya que sólo es necesario, la solubilización de la  $\gamma$ -CD en medio acuoso, la modificación del pH antes y después de incorporar la AmB y la esterilización por filtración preferiblemente en campana de flujo laminar. También hay que destacar que el coste final de la formulación es inferior al de la Fungizona<sup>®</sup>, teniendo en cuenta que sólo es necesario preparar una única formulación por paciente (suponiendo un tratamiento de un mes), evitando la preparación

extemporánea diaria de la Fungizona<sup>®</sup> y si a esto añadimos que el precio de la  $\gamma$ -CD es relativamente económico (el precio orientativo oscila en torno a los \$80/kg [198], supondría un gasto de \$0.08/ paciente, ya que se necesita 1 g de  $\gamma$ -CD para preparar 10 mL de formulación). Actualmente existen múltiples distribuidores de CD a nivel mundial, por lo que el poder adquirirlas no implica ningún obstáculo.

La elección del Timerosal<sup>®</sup> (compuesto organomercurio) como agente bacteriostático se debe a su potente actividad frente a *Staphylococcus aureus*. Aunque el uso de Timerosal<sup>®</sup> puede dar lugar a reacciones de hipersensibilidad, normalmente su uso en vacunas es lo que está más relacionado con este tipo de efecto adverso, más que su administración a nivel ocular. De hecho, hay múltiples formulaciones oftálmicas comercializadas que contienen Timerosal<sup>®</sup> como agente bacteriostático tales como Indocollyre<sup>®</sup>, Clarvisan<sup>®</sup> o Voltaren<sup>®</sup> entre otras [293].

Cuando se trata de tratamientos oculares crónicos como el glaucoma, los efectos adversos de los conservantes son de suma importancia para evitar problemas de irritación y alergias; sin embargo, el tratamiento de queratitis fúngica suele durar entre 3 y 4 semanas, siendo prioritario en este caso reducir el riesgo de contaminación por potenciales agentes patógenos para evitar complicaciones. *S.aureus* es uno de los agentes patógenos más comunes encontrados en envases de colirios contaminados pero además, es uno de los agentes responsables de causar queratitis bacterianas [294]. El Timerosal<sup>®</sup> presenta una actividad 6 veces superior que el cloruro de benzalconio frente a *S. aureus*. Esta es una de las razones por las que se decidió utilizarlo como agente bacteriostático en la formulación oftálmica; además el Timerosal<sup>®</sup> es activo frente a numerosos hongos patógenos (tales como *Fusarium* o *Aspergillus*), pudiendo potenciar la actividad de la AmB [295].

Un último punto relevante es la mayor actividad antifúngica *in vitro* del colirio AmB:  $\gamma$ -CD (sin agente bacteriostático) frente al colirio preparado a partir de Fungizona<sup>®</sup>. Esta mayor actividad antifúngica parece estar relacionada no solamente con un incremento en la solubilidad de la AmB sino también con un efecto sinérgico entre la AmB y la  $\gamma$ -CD. En el ensayo *in vitro* para medir la actividad antifúngica se utilizó como referencia AmB disuelta en DMSO. La actividad antifúngica del complejo AmB:  $\gamma$ -CD también fue superior que la actividad obtenida por la AmB disuelta en DMSO. Tanto el DMSO como las CD son promotores de la absorción y son capaces de solubilizar la AmB en

estado monomérico. Por esta razón, parece que el incremento en la actividad antifúngica se debe no sólo a la solubilización del fármaco sino también a un efecto sinérgico entre las CD y la AmB. Una de las posibles explicaciones podría estar relacionada con la capacidad que tienen las CD para interaccionar con la membrana de organismos vivos, produciendo una desestabilización y alteración física de las mismas [296, 297]. Este efecto desestabilizante de membranas junto con el mecanismo de acción de la AmB (formación de poros en la membrana) pueden actuar sinérgicamente dando lugar a una alteración de la permeabilidad celular y potenciando así la muerte de las células y por lo tanto la actividad antifúngica [297]. El efecto sinérgico entre CD y AmB se ha observado en otras formulaciones tópicas, traducándose en un aumento de eficacia antifúngica y antiparasitaria lo que ha dado lugar a una patente (Anexo I).

Además del vacío terapéutico de fármacos de AmB de administración ocular, tampoco se conoce ninguna formulación de AmB comercializada por VO. Como se ha citado anteriormente, la administración oral de AmB tendría múltiples beneficios tales como, entre otros, mejorar el cumplimiento terapéutico, reducir el tiempo de hospitalización del paciente y facilitar el acceso a la terapia con AmB.

En determinados países existe comercializada AmB para la vía oral en forma de suspensión o en comprimidos cuyo objetivo es el tratamiento de infecciones locales orofaríngeas y gastrointestinales. Sin embargo, no es útil para tratar infecciones sistémicas ya que la absorción oral de fármaco es mínima, alcanzándose concentraciones subterapéuticas en plasma.

La regla de Lipinski establece una serie de criterios que permiten estimar la biodisponibilidad oral de un fármaco en base a ciertas características fisicoquímicas del mismo [298]. Se considera que un fármaco no es un buen candidato para la VO cuando no cumple alguno de los siguientes criterios:

- a) el número de grupos (hidroxilo y amino) capaces de donar átomos de hidrógeno para formar puentes de hidrógeno debe de ser menor a 5;
- b) el número de grupos (átomos de nitrógeno, oxígeno o flúor) capaces de aceptar átomos de hidrógeno para formar puentes de hidrógeno debe de ser menor a 10;
- c) debe tener un peso molecular inferior a 500 Da;
- d) debe poseer un  $\log P < 5$ .

La AmB como tal no es una buena candidata para ser administrada por VO ya que incumple 3 de los 4 criterios de la regla de Lipiski, al poseer 12 grupos donadores de H, 18 grupos aceptores de H, peso molecular de 924 g/mol y logP de 0.95. De hecho, se ha estimado una biodisponibilidad oral de entre 0.2 – 0.9% [203].

Para poder mejorar la absorción oral de la AmB, es necesario desarrollar un sistema que permita mejorar la solubilidad en los fluidos gastrointestinales y al mismo tiempo incrementar la permeabilidad a través de la barrera gastrointestinal. Parece ser que las formulaciones lipídicas son las que han obtenidos mejores resultados hasta el momento [202]; sin embargo, los estudios preclínicos han sido llevados a cabo en roedores y en muchas ocasiones existen importantes diferencias farmacocinéticas entre roedores y humanos. Por esta razón, es necesario realizar estudios en especies de mayor tamaño para tener una mejor correlación a la hora de extrapolar los resultados obtenidos en humanos.

A la hora de diseñar el estudio farmacocinético con nuevas formulaciones desarrolladas para la VO, hay que tener en cuenta una serie de puntos importantes:

- a) por lo general, parece ser más conveniente utilizar regímenes de dosificación basados en bajas dosis múltiples en vez de altas dosis únicas. La principal razón es que no existe una relación proporcional entre la dosis administrada y la cantidad absorbida de fármaco, probablemente debido a la existencia de algún mecanismo de saturación o que el fármaco sea sustrato de la glicoproteína –P localizada a nivel intestinal [299]. De modo que aunque se administren cantidades muy altas de fármaco, la biodisponibilidad no es mayor y de hecho, podría intensificar los efectos adversos sobre todo a nivel gastrointestinal;
- b) es recomendable llevar a cabo estudios de toxicidad, prestando especial atención a la toxicidad gastrointestinal, ya que para conseguir acumular cantidad suficiente de AmB en los tejidos diana, normalmente es necesario realizar múltiples administraciones por VO, por lo que el fármaco estará más tiempo en contacto con la membrana de las células intestinales;
- c) a la hora de determinar la absorción oral de AmB es conveniente analizar no solamente los niveles plasmáticos, sino también la cantidad de fármaco acumulada en tejidos, ya que existe una escasa correlación entre ambos y podría ocurrir que aunque las concentraciones de fármaco en plasma fuesen

subterapéuticas, en los tejidos se podría acumular cantidad suficiente de AmB como para tener efecto farmacológico.

A la hora de seleccionar un excipiente para desarrollar una formulación de AmB para la VO, se decidió utilizar un derivado del chitosán debido a las características que reúne. Es un excipiente natural muy abundante [222], seguro, biocompatible y biodegradable [223, 224], tiene propiedades mucoadhesivas [223] que mejoran la permeabilidad de fármacos a través de la barrera gastrointestinal [225] y además presenta ciertas propiedades antimicrobianas y antifúngicas [226]. Sin embargo, su uso está limitado debido a su baja solubilidad a pH fisiológico 7.4 [227]. Para hacer frente a este problema, se utilizó un derivado anfifílico del chitosán (GCPQ), con buena capacidad para formar micelas en medios acuosos [230]. GCPQ es un chitosán cuaternizado (tras la alquilación exhaustiva del grupo amino) en el que se han introducido grupos hidrofílicos ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ ) dando lugar a glicol chitosán y grupos hidrofóbicos (cadena hidrocarbonada del ácido palmítico). A la hora de formular el polímero con la AmB, ésta se solubilizó en medio básico de manera que el grupo carboxílico estuviera ionizado y así favorecer la interacción electrostática con el grupo amonio cuaternario del polímero. Además, gracias al carácter anfifílico del polímero, se favorece la encapsulación del fármaco probablemente debido a interacciones hidrofílicas (entre los grupos hidroxilo de ambas moléculas) e hidrofóbicas entre la cadena del ácido palmítico del polímero y la cadena heptaénica de la AmB.

La formulación de AmB con GCPQ dio lugar a nanopartículas con un potencial zeta ligeramente positivo (+ 3 mV) y con un tamaño de partícula caracterizado por dos poblaciones de 216 nm (40.9%) y 35 nm (59.6%). Tanto la carga como el tamaño de partícula juegan un papel clave en el paso de las partículas a través de la barrera gastrointestinal. Varios autores han observado que la absorción gastrointestinal es más eficiente cuando las partículas son neutras o están cargadas positivamente y presentan un tamaño de partícula por debajo de los 500 nm [300-302]. Para que las partículas puedan llegar hasta los enterocitos para poder ser absorbidas, tienen que cruzar la barrera constituida por el mucus secretado por dichas células, el cual se caracteriza por tener residuos de ácido siálico que confieren carga negativa. Por lo tanto, partículas con carga negativa tienen mayor dificultad para atravesar el mucus y llegar hasta los enterocitos debido a repulsiones electrostáticas, mientras que, partículas cargadas positivamente pueden interaccionar electrostáticamente con los residuos cargados

negativamente en el mucus teniendo propiedades mucoadhesivas [303]. El simil de Fungizona y la AmB en dextrosa a diferencia de la formulación AmB:GCPQ están caracterizadas por tener un potencial zeta muy negativo y un mayor tamaño de partícula, lo que podría explicar la menor absorción oral del fármaco respecto a la biodisponibilidad oral alcanzada con la formulación AmB:GCPQ.

En la última publicación queda plasmada la importancia de analizar la concentración de AmB no sólo en plasma sino también en tejidos. Algunas de las formulaciones de AmB de administración IV tienen un perfil farmacocinético caracterizado por una rápida eliminación de plasma seguida de acumulación en tejidos. De forma similar, la administración por VO de una única dosis de AmB:GCPQ da lugar a bajas concentraciones en plasma, pero sin embargo, niveles mucho más altos en tejidos, principalmente en los órganos del SRE (hígado, bazo y médula ósea). La acumulación en estos órganos podría ser consecuencia de una absorción linfática a través de las placas de Peyer localizadas en el tejido linfoide asociado al intestino. Una vez que las partículas cruzan el epitelio intestinal, podrían ser endocitadas por células del sistema inmunitario y circular a través del sistema linfático a diferentes zonas del organismo [304]. La concentración máxima en el hígado se alcanza a las 4 h tras la administración oral de AmB:GCPQ, lo cual posiblemente esté relacionado con un proceso de absorción a través del enterocito seguido del transporte por la vena porta hasta el hígado. Sin embargo, las partículas podrían ser absorbidas en parte por la vía linfática, lo que podría explicar porque en órganos como el bazo, los niveles de AmB son más altos a las 2 h post-administración que los valores encontrados en hígado.

La acumulación preferencial en los órganos del SRE podría explicar la actividad antileishmania de la formulación de AmB:GCPQ tras su administración por VO, ya que el fármaco parece ser vectorizado hacia los órganos donde se acumulan los parásitos. Pero además de en hígado y bazo, se han encontrado altas concentraciones de fármaco en pulmón, de ahí que sea interesante en un futuro llevar a cabo estudios de eficacia en modelos de aspergilosis pulmonar.

Para poder obtener una eficacia leishmanicida comparable al AmBisome<sup>®</sup> administrado por vía parenteral, es necesario administrar la formulación AmB:GCPQ por vía oral durante al menos 10 días consecutivos, ya que con terapias más cortas, parece ser que la concentración alcanzada en los órganos diana no es suficiente. Ahora bien, la



administración continuada podría causar efectos adversos sobre todo a nivel gastrointestinal. En cuanto a la toxicidad renal, parece ser que la formulación AmB:GCPQ por VO es más segura que el AmBisome® por vía parenteral. Durante el estudio de eficacia, la concentración de fármaco acumulada a nivel renal con la formulación AmB:GCPQ fue significativamente menor que con el AmBisome®.

Por último hay que reseñar la importancia de llevar a cabo estudios farmacocinéticos en especies de mayor tamaño que los roedores, para poder obtener una mejor correlación a la hora de extrapolar los resultados en humanos. Por ejemplo, las concentraciones plasmáticas obtenidas tras una única administración oral de AmB:GCPQ fueron menores en perros que en ratones. Existen varias posibles causas que podrían explicar estas diferencias. En primer lugar, en situaciones de ayuno, el pH del estómago en los perros (pH 2.03) [305] es muy inferior al de los ratones (pH 4.04) [306], pudiendo ser degradado una mayor cantidad de fármaco durante su paso por el estómago. En segundo lugar, la secreción biliar es menor en perros (12 mL/Kg/día) que en ratones (100 mL/Kg/día) [307], pudiendo estar relacionado con una menor solubilización de la AmB a nivel intestinal. Por otro lado, la tasa de filtración glomerular es mayor en ratones (14 mL/min/Kg) que en perros (6 mL/min/Kg) [307], lo que podría explicar porqué la concentración plasmática entre las 8 y las 24 h disminuye un 39 % en ratones y solamente un 7 % en perros.

Otro punto a tener en cuenta, es que a lo largo del intestino delgado, el número de placas de Peyer existentes en perros (entre 26 - 39) es muy superior al número existente en ratones (entre 6 - 12) [306, 308]; por lo tanto, la absorción linfática podría estar incrementada en el perro dando lugar a una mayor acumulación de fármaco en los órganos del SRE; sin embargo, sería necesario hacer más estudios para poder corroborar esta hipótesis así como evaluar la contribución real del transporte linfático en la cantidad de AmB absorbida, ya que por lo general, la capacidad del transporte linfático es mucho más reducida que la absorción por la vía porta, debido a que el flujo de sangre a nivel intestinal es 500 veces superior que el de la linfa [309].



Ciclodextrinaschitosánmodificadoanf  
otericinaBpoliagregadotamaño de partí  
culaabsorciónoraltoxicidadhemolítica  
administración **5.Conclusiones/**  
CiclodextrinasAmB **Conclusions**  
AmBisomeFungizonaanfotericinaBd  
iméricaacumulaciónenhígadoybazo  
re sultandoser costeefectivayseguranefr  
otoxicidadbiodistribuciónprolongada  
circulaciónplasmáticaamplio volumen  
de distribución tamaño de partículaanf  
otericinaBpoliagregadosistemaderet  
ículo endotelialtoxicidadhemolíticama  
crófagos*Leishmania*AmBBeagleshipot  
énsioneficaciachitosánmodificadobaj  
a solubilidadescasabiodeponibilidadp  
or vía oral excipientesciclodextrinasde



## 5. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS

1. El tamaño de partícula de los agregados de AmB juega un papel clave tanto en la toxicidad hemolítica como en la distribución del fármaco por el organismo tras la administración IV, pudiéndose concluir que a mayor tamaño de partícula, menor toxicidad hemolítica y mayor acumulación en los tejidos principalmente del SRE.
2. La AmB poliagregada al estar constituida por agregados de mayor tamaño que la Fungizona<sup>®</sup> es una alternativa segura y coste-efectiva en el tratamiento de la VL por vía parenteral, ya que presenta mínima toxicidad hemolítica (similar al AmBisome<sup>®</sup>) y la administración de altas dosis (10 mg/kg) son bien toleradas, lo que permite reducir el número de administraciones necesarias para erradicar la enfermedad, al acumularse mayor cantidad de fármaco con una única dosis.
3. La encapsulación de AmB poliagregada en microesferas de albúmina ha demostrado reducir la toxicidad hemolítica causada por el fármaco libre y disminuir el riesgo de interacciones con fármacos que presentan alta unión a proteínas plasmáticas, ya que la AmB permanece unida a la albúmina de las microesferas después de la administración IV.
4. La  $\gamma$ -CD es capaz de solubilizar a la AmB en estado monomérico y de incrementar la actividad antifúngica *in vitro* del fármaco, resultando ser un 30% superior a la de la Fungizona<sup>®</sup>. De todas las formulaciones elaboradas, la que está constituida por AmB (0.1%):  $\gamma$ -CD (10%): Timerosal<sup>®</sup> (0.005%) es económica, estable, fácil de preparar y como reúne unas condiciones óptimas de pH, osmolaridad y esterilidad ha sido la elegida para ser administrada por vía oftálmica.
5. El derivado anfifílico del quitosán GCPQ es capaz de encapsular la AmB dando lugar a nanopartículas que incrementan la biodisponibilidad oral del fármaco desde un 0.9 según aparece recogido en bibliografía hasta un 24.7% y presentan un perfil farmacocinético caracterizado por alcanzar bajas concentraciones en

plasma y riñón y altos niveles de fármaco en órganos del SRE tales como hígado, bazo y médula ósea.

6. Se ha comprobado que la administración de la formulación AmB:GCPQ por vía oral durante 10 días consecutivos presenta una eficacia similar a la administración única de AmBisome<sup>®</sup> por vía parenteral en un modelo de leishmaniasis visceral murino. Además, la concentración de fármaco alcanzada a nivel renal con la formulación AmB:GCPQ fue significativamente inferior a los niveles obtenidos con el AmBisome<sup>®</sup>, por lo que parece ser una formulación más segura en términos de nefrotoxicidad.
7. Es necesario desarrollar estrategias que permitan mejorar tanto la solubilidad, biodisponibilidad y acumulación de AmB en los órganos diana en función del tipo de enfermedad a tratar, el perfil farmacocinético deseado y la vía de administración. La AmB poliagregada, el complejo AmB:γ-CD y las nanopartículas formadas por la interacción de AmB:GCPQ han demostrado ser formulaciones fáciles de preparar, con un favorable balance beneficio/riesgo y una buena relación coste-eficacia para el tratamiento de infecciones fúngicas y/o parasitarias para ser administradas por vía IV, ocular y oral respectivamente.

1. AmB aggregates particle size plays a key role in both hemolytic toxicity and drug biodistribution after IV administration. The larger the particle size, the lower the hemolytic toxicity and also the higher the accumulation mainly in the reticulo-endothelial system organs and cells.
2. Poly-aggregated AmB composed of bigger particle size aggregates than Fungizone<sup>®</sup> is safer and can be use as a cost-effective alternative therapy for visceral leishmaniasis due to the fact that it has low hemolytic toxicity (similar to AmBisome<sup>®</sup>) and the IV administration of high AmB doses (10 mg/kg) are well tolerated. Thus ability to administer high doses can decrease the number of IV administrations that are required to eradicate the disease because higher amount of AmB is accumulated after a single dose.
3. The hemolytic toxicity of the poly-aggregated AmB can be decreased by loading the drug in albumin microspheres. In addition, the risk of potential interactions with highly plasma protein bound drugs is decreased as AmB is highly bound to the albumin of the microspheres even after IV administration.
4.  $\gamma$ -CDs were shown to be able to solubilise AmB in monomer form as well as to increase its *in vitro* antifungal activity resulting in a 30% higher activity than Fungizone<sup>®</sup>. The proposed extemporaneous formulation composed of AmB (0.1%):  $\gamma$ -CD (10%): Thimerosal<sup>®</sup> (0.005%) is inexpensive and easy to prepare with an acceptable pH, osmolarity and sterility for ophthalmic use, maintaining its antifungal activity and being physicochemically stable over 30 days at room temperature.
5. Quaternary ammonium palmitoyl chitosan (GCPQ) has shown to be able to form AmB loaded nanoparticles with enhanced oral bioavailability (from 0.9% to 24.7%). The pharmacokinetic profile is characterized by low AmB plasma and renal concentration and high levels in the reticulo-endothelial system organs and cells such as liver, spleen, and bone marrow.

6. The oral administration of AmB:GCPQ formulation during 10 consecutive days has the same efficacy as parentally administered AmBisome<sup>®</sup> in a single dose in a murine model of visceral leishmaniasis. AmB:GCPQ is a safer formulation than AmBisome<sup>®</sup> because lower AmB levels are accumulated in kidneys at the end of the treatment.
7. Strategies to enhance the solubility, bioavailability and tissue accumulation of AmB need to be optimised depending on the disease state, desired pharmacokinetics and route of administration. In this study we have demonstrated that poly-aggregated AmB, AmB-CD complexes and AmB-GCPQ nanoparticles are useful formulations for IV, ophthalmic and oral administration respectively able to overcome challenges related to the treatment of fungal infections or parasitic diseases such as visceral leishmaniasis providing easily prepared and cost-effective treatment alternatives with improved risk-benefit ratio.



AmBisomeFungizonaanfotericinaBp  
oliagregadaacumulaciónhígadobazor  
esultandosercosteefectivaysegurafár  
macotoxicidad **6. Bibliografía**

ciclodextrinaschitosánmodificadoanf  
otericinapoliagregadatamañodepartí  
culaabsorciónoraltoxicidadhemolítica  
biodistribuciónprolongadacirculació  
nplasmáticaampliovolumendedistrib  
ución tamañodepartículaanfotericina  
Bpoliagregadosistemaderetículoendo  
telieltoxicidadhemolíticamacrófagos*L*  
*eishmania***AmB**Beagleshipotensiónefi  
caciachitosánmodificadobajasolubilid  
adescasabiodisponibilidadporvíaaoral  
excipientesciclodextrinasdesoxicolat  
osódicoamphotericinBcanacidadanti



## **8. BIBLIOGRAFÍA**

- [1] L. Villa e-Medimecum. Guía on-line de terapia farmacológica, EINSa, Ediciones informatizadas, SA, España, 2012.
- [2] A. Lemke, A.F. Kiderlen, O. Kayser, Amphotericin B, *Applied microbiology and biotechnology*, 68 (2005) 151-162.
- [3] R. Donovan, W. Gold, J.F. Pagano, H.A. Stout, Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies, *Antibiotics annual*, 3 (1955) 579-586.
- [4] P.J. Kozinn, C.L. Taschdjian, D. Dragutsky, A. Minsky, Treatment of cutaneous candidiasis in infancy and childhood with nystatin and amphotericin B, *Antibiotics annual*, (1956) 128-134.
- [5] E.R. Harrell, A.C. Curtis, The treatment of North American blastomycosis with amphotericin B, *A.M.A. archives of dermatology*, 76 (1957) 561-568; discussion 568-569.
- [6] M.J. Fiese, Treatment of disseminated coccidioidomycosis with amphotericin B; report of a case, *California medicine*, 86 (1957) 119-120.
- [7] J.P. Utz, D.B. Louria, N. Feder, C.W. Emmons, C.N. Mc, A report of clinical studies on the use of amphotericin in patients with systemic fungal diseases, *Antibiotics annual*, 5 (1957) 65-70.
- [8] L. Landau, B. Achilladelis, A. Scriabine, *Pharmaceutical Innovation: Revolutionizing Human Health*, in, Chemical Heritage Foundation, Philadelphia, USA, 1999, pp. 176-178.
- [9] D.J. Sheehan, C.A. Hitchcock, C.M. Sibley, Current and emerging azole antifungal agents, *Clinical microbiology reviews*, 12 (1999) 40-79.
- [10] L. Ostrosky-Zeichner, K.A. Marr, J.H. Rex, S.H. Cohen, Amphotericin B: time for a new "gold standard", *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 37 (2003) 415-425.
- [11] M. Kleinberg, What is the current and future status of conventional amphotericin B?, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27S (2006) S12-S16.
- [12] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Centro de información on-line de medicamentos. Ficha técnica de medicamentos. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/>. [Fecha de acceso: 26/01/2013].
- [13] J.J. Torrado, R. Espada, M.P. Ballesteros, S. Torrado-Santiago, Amphotericin B formulations and drug targeting, *Journal of pharmaceutical sciences*, 97 (2008) 2405-2425.
- [14] H.Y. Sun, B.D. Alexander, O. Lortholary, F. Dromer, G.N. Forrest, G.M. Lyon, J. Somani, K.L. Gupta, R. del Busto, T.L. Pruett, C.D. Sifri, A.P. Limaye, G.T. John, G.B. Klintmalm, K. Pursell, V. Stosor, M.I. Morris, L.A. Dowdy, P. Munoz, A.C. Kalil, J. Garcia-Diaz, S. Orloff, A.A. House, S. Houston, D. Wray, S. Huprikar, L.B. Johnson, A. Humar, R.R. Razonable, S. Husain, N. Singh, Lipid formulations of amphotericin B significantly improve outcome in solid organ transplant recipients with central nervous system cryptococcosis, *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49 (2009) 1721-1728.
- [15] G. Barratt, P. Legrand, Comparison of the efficacy and pharmacology of formulations of amphotericin B used in treatment of leishmaniasis, *Current opinion in infectious diseases*, 18 (2005) 527-530.

- [16] T.A. Furtado, Clinical results in the treatment of American leishmaniasis with oral and intravenous amphotericin, *Antibiotics annual*, 7 (1959) 631-637.
- [17] Drug Bank:Open Data Drug & Drug Target Database. Disponible en: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00681>. [Fecha de acceso: 06/01/2013].
- [18] L. Soler, P. Caffrey, H. McMahon, Effects of new amphotericin analogues on the scrapie isoform of the prion protein, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780 (2008) 1162-1167.
- [19] USP- United States Pharmacopeial, 30th ed., 2007.
- [20] I. Asher, *Analytical Profiles of Drug Substances* Academic Press London, 1977.
- [21] A. Moffat, V. Jackson, M. Moss, B. Widdop, Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids, and Post-Mortem Material, in, *The Pharmaceutical Press*, London, 1986, pp. 1223.
- [22] A.A. Volmer, A.M. Szpilman, E.M. Carreira, Synthesis and biological evaluation of amphotericin B derivatives, *Natural product reports*, 27 (2010) 1329-1349.
- [23] K. Nicolaou, R. Daines, T. Chakraborty, Y. Ogawa, Total synthesis of amphotericin B, *J. Am. Chem. Soc.*, 109 (1987) 2821-2822.
- [24] J. Carstensen, C. Rhodes, *Drug stability: principles and practices*, in, Marcel Dekker, New York, 2000.
- [25] L. Kagan, P. Gershkovich, K.M. Wasan, D.E. Mager, Physiologically based pharmacokinetic model of amphotericin B disposition in rats following administration of deoxycholate formulation (Fungizone(R)): pooled analysis of published data, *The AAPS journal*, 13 (2011) 255-264.
- [26] J. Brajtburg, J. Bolard, Carrier effects on biological activity of amphotericin B, *Clinical microbiology reviews*, 9 (1996) 512-531.
- [27] R. Espada, S. Valdespina, C. Alfonso, G. Rivas, M.P. Ballesteros, J.J. Torrado, Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations, *International journal of pharmaceutics*, 361 (2008) 64-69.
- [28] A. Lavasanifar, J. Samuel, S. Sattari, G.S. Kwon, Block copolymer micelles for the encapsulation and delivery of amphotericin B, *Pharmaceutical research*, 19 (2002) 418-422.
- [29] P. Aramwit, B.G. Yu, A. Lavasanifar, J. Samuel, G.S. Kwon, The effect of serum albumin on the aggregation state and toxicity of amphotericin B, *Journal of pharmaceutical sciences*, 89 (2000) 1589-1593.
- [30] J. Milhaud, V. Ponsinet, M. Takashi, B. Michels, Interactions of the drug amphotericin B with phospholipid membranes containing or not ergosterol: new insight into the role of ergosterol, *Biochim Biophys Acta*, 1558 (2002) 95-108.
- [31] E. Ruckenstein, R. Nagarajan, Critical Micelle Concentration. A Transition Point for Micellar Size Distribution, *The Journal of Physical Chemistry*, 79 (1975) 2622-2626.
- [32] D. Romanini, G. Avallè, B. Nerli, G. Pico, Thermodynamic and spectroscopic features of the behavior of amphotericin B in aqueous medium, *Biophysical chemistry*, 77 (1999) 69-77.
- [33] P. Wasko, R. Luchowski, K. Tutaj, W. Grudzinski, P. Adamkiewicz, W.I. Gruszecki, Toward understanding of toxic side effects of a polyene antibiotic amphotericin B: fluorescence spectroscopy reveals widespread formation of the specific supramolecular structures of the drug, *Molecular pharmaceutics*, 9 (2012) 1511-1520.
- [34] W.I. Gruszecki, M. Gagos, M. Herec, Dimers of polyene antibiotic amphotericin B detected by means of fluorescence spectroscopy: molecular organization in solution and in lipid membranes, *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 69 (2003) 49-57.

- [35] J. Mazerski, E. Borowski, Molecular dynamics of amphotericin B I. Single molecule in vacuum and water, *Biophysical chemistry*, 54 (1995) 49-60.
- [36] J. Mazerski, E. Borowski, Molecular dynamics of amphotericin B. II. Dimer in water, *Biophysical chemistry*, 57 (1996) 205-217.
- [37] L.C. Egito, S.R. de Medeiros, M.G. Medeiros, J.C. Price, E.S. Egito, Evaluation of the relationship of the molecular aggregation state of amphotericin B in medium to its genotoxic potential, *Journal of pharmaceutical sciences*, 93 (2004) 1557-1565.
- [38] P. Legrand, E.A. Romero, B.E. Cohen, J. Bolard, Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 36 (1992) 2518-2522.
- [39] P. Tancrede, J. Barwicz, S. Jutras, I. Gruda, The effect of surfactants on the aggregation state of amphotericin B, *Biochim Biophys Acta*, 1030 (1990) 289-295.
- [40] J.A. Sanchez-Brunete, M.A. Dea, S. Rama, F. Bolas, J.M. Alunda, S. Torrado-Santiago, J.J. Torrado, Amphotericin B molecular organization as an essential factor to improve activity/toxicity ratio in the treatment of visceral leishmaniasis, *Journal of drug targeting*, 12 (2004) 453-460.
- [41] R. Espada, S. Valdespina, M.A. Dea, G. Molero, M.P. Ballesteros, F. Bolas, J.J. Torrado, In vivo distribution and therapeutic efficacy of a novel amphotericin B poly-aggregated formulation, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 61 (2008) 1125-1131.
- [42] H. Ruiz, Tesis doctoral: Desarrollo y caracterización de una formulación tópica de anfotericina B con gamma-ciclodextrina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2010.
- [43] H.E. Lambing, B.D. Wolf, S.C. Hartsel, Temperature effects on the aggregation state and activity of amphotericin B, *Biochim Biophys Acta*, 1152 (1993) 185-188.
- [44] F. Gaboriau, M. Cheron, L. Leroy, J. Bolard, Physico-chemical properties of the heat-induced 'superaggregates' of amphotericin B, *Biophysical chemistry*, 66 (1997) 1-12.
- [45] M. Gagos, M. Herec, M. Arczewska, G. Czernel, M. Dalla Serra, W.I. Gruszecki, Anomalous high aggregation level of the polyene antibiotic amphotericin B in acidic medium: implications for the biological action, *Biophysical chemistry*, 136 (2008) 44-49.
- [46] J. Barwicz, P. Tancrede, The effect of aggregation state of amphotericin-B on its interactions with cholesterol- or ergosterol-containing phosphatidylcholine monolayers, *Chemistry and physics of lipids*, 85 (1997) 145-155.
- [47] J. Bolard, P. Legrand, F. Heitz, B. Cybulska, One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium, *Biochemistry*, 30 (1991) 5707-5715.
- [48] T.A. Diezi, G. Kwon, Amphotericin B/sterol co-loaded PEG-phospholipid micelles: effects of sterols on aggregation state and hemolytic activity of amphotericin B, *Pharmaceutical research*, 29 (2012) 1737-1744.
- [49] Y. Ohtani, T. Irie, K. Uekama, K. Fukunaga, J. Pitha, Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes, *European journal of biochemistry / FEBS*, 186 (1989) 17-22.
- [50] W.P. Norred, H.C. Ansel, I.L. Roth, J.J. Peifer, Mechanism of dimethyl sulfoxide-induced hemolysis, *Journal of pharmaceutical sciences*, 59 (1970) 618-622.
- [51] J.E. Bennett, G.J. Hill, 2nd, W.T. Butler, C.W. Emmons, Correlation of Particle Size of Intravenous Amphotericin B with Toxic and Chemotherapeutic Effects, *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)*, 161 (1963) 745-752.

- [52] J. Barwicz, S. Christian, I. Gruda, Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 36 (1992) 2310-2315.
- [53] J.A. Sanchez-Brunete, M.A. Dea, S. Rama, F. Bolas, J.M. Alunda, R. Raposo, M.T. Mendez, S. Torrado-Santiago, J.J. Torrado, Treatment of experimental visceral leishmaniasis with amphotericin B in stable albumin microspheres, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48 (2004) 3246-3252.
- [54] L. Ordonez-Gutierrez, R. Espada-Fernandez, M.A. Dea-Ayuela, J.J. Torrado, F. Bolas-Fernandez, J.M. Alunda, In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*, *Int J Antimicrob Agents*, 30 (2007) 325-329.
- [55] J. Torrado, H. Ruiz, D. Serrano, G. Molero, N. Cano, P. Bilbao, M. Vegas, F. Bolás, M. Dea, Formulaciones tópicas de anfotericina B y método de obtención, UCM, Spain, 2012, pp. 58.
- [56] C. Petit, V. Yardley, F. Gaboriau, J. Bolard, S.L. Croft, Activity of a heat-induced reformulation of amphotericin B deoxycholate (fungizone) against *Leishmania donovani*, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43 (1999) 390-392.
- [57] F. Gaboriau, M. Cheron, C. Petit, J. Bolard, Heat-induced superaggregation of amphotericin B reduces its in vitro toxicity: a new way to improve its therapeutic index, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41 (1997) 2345-2351.
- [58] R. Espada, S. Valdespina, G. Molero, M.A. Dea, M.P. Ballesteros, J.J. Torrado, Efficacy of alternative dosing regimens of poly-aggregated amphotericin B, *Int J Antimicrob Agents*, 32 (2008) 55-61.
- [59] S.S. Davis, Biomedical applications of nanotechnology--implications for drug targeting and gene therapy, *Trends in biotechnology*, 15 (1997) 217-224.
- [60] H. Hillaireau, P. Couvreur, Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66 (2009) 2873-2896.
- [61] A. Chonn, P.R. Cullis, D.V. Devine, The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes, *Journal of immunology*, 146 (1991) 4234-4241.
- [62] K.C. Carter, T.F. Dolan, J. Alexander, A.J. Baillie, C. McColgan, Visceral leishmaniasis: drug carrier system characteristics and the ability to clear parasites from the liver, spleen and bone marrow in *Leishmania donovani* infected BALB/c mice, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 41 (1989) 87-91.
- [63] P.M. Kaye, M. Svensson, M. Ato, A. Maroof, R. Polley, S. Stager, S. Zubairi, C.R. Engwerda, The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis, *Immunological reviews*, 201 (2004) 239-253.
- [64] D.E. Owens, N.A. Peppas, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *International journal of pharmaceutics*, 307 (2006) 93-102.
- [65] J. Martín Capítulo 19: Microscopía para el estudio de materiales y láminas delgadas, in: J. Albella (Ed.) *Láminas delgadas y recubrimientos: Preparación, propiedades y aplicaciones*, Solana e Hijos, A.G., S.A., Madrid 2003, pp. 519-540.
- [66] F. Liu, J. Wu, K. Chen, D. Xue, Morphology Study by Using Scanning Electron Microscopy in: A. Méndez-Vilas, J. Díaz (Eds.) *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, Formatex, 2010.
- [67] A. Zahr, M. Pishko, Chapter 16: Nanotechnology for cancer chemotherapy, in: M. de Villiers, P. Aramwit, G. Kwon (Eds.) *Nnotechnology in drug delivery*, Springer, New York, 2009, pp. 504-505.
- [68] G. Schwartzman, I. Asher, V. Folen, W. Brannon, J. Taylor, Ambiguities in IR and X-ray characterization of amphotericin B, *Journal of pharmaceutical sciences*, 67 (1978) 398-400.

- [69] I. Ivanisevic, R. McClurg, P. Schields, Uses of X-Ray Powder Diffraction In the Pharmaceutical Industry, in: S. Gad (Ed.) *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development, and Manufacturing.*, John Wiley & Sons, Inc., 2010, pp. 1-42.
- [70] S. Byrn, R. Pfeiffer, M. Ganey, C. Hoiberg, G. Poochikian, Pharmaceutical solids: a strategic approach to regulatory considerations, *Pharmaceutical research*, 12 (1995) 945-954.
- [71] C. Hung , F. Lam, D. Perrier, A. Souter, A stability study of amphotericin B in aqueous media using factorial design, *International journal of pharmaceutics*, 44 (1988) 117-123.
- [72] J. Groeschke, I. Solassol, F. Bressolle, F. Pinguet, Stability of amphotericin B and nystatin in antifungal mouthrinses containing sodium hydrogen carbonate, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 42 (2006) 362-366.
- [73] A. Janoff, W. Perkins, S. Saletan, C. Swenson, Amphotericin B lipid complex (ABLC™): a molecular rationale for the attenuation of amphotericin B-related toxicities, *J Liposome Res*, 3 (1993) 451-471.
- [74] K. Morand, A.C. Bartoletti, A. Bochot, G. Barratt, M.L. Brandely, F. Chast, Liposomal amphotericin B eye drops to treat fungal keratitis: physico-chemical and formulation stability, *International journal of pharmaceutics*, 344 (2007) 150-153.
- [75] V. Vanneaux, V. Proust , M. Chéron, M. Besnard, O. Corriol, F. Gimenez, E. Singlas, P. Legrand, A physical and chemical stability study of amphotericin B lipid complexes (Abelcet) after dilution in dextrose 5%, *The European Journal of Hospital Pharmacy Science*, 13 (2007) 10-13.
- [76] J. Abrahamsson, S. Abrahamsson, B. Hellqvist, K. Larsson, I. Pascher, S. Sundell, Cholesteryl sulphate and phosphate in the solid state and in aqueous systems, *Chemistry and physics of lipids*, 19 (1977) 213-222.
- [77] J. Chen, G.J. Yan, R.R. Hu, Q.W. Gu, M.L. Chen, W. Gu, Z.P. Chen, B.C. Cai, Improved pharmacokinetics and reduced toxicity of brucine after encapsulation into stealth liposomes: role of phosphatidylcholine, *Int J Nanomedicine*, 7 (2012) 3567-3577.
- [78] C. Ernst, J. Grange, H. Rinnert, G. Dupont, J. Lematre, Structure of amphotericin B aggregates as revealed by UV and CD spectroscopies, *Biopolymers*, 20 (1981) 1575-1588.
- [79] Ultraviolet and visible spectroscopy, in: P. Kalsi (Ed.) *Spectroscopy of organic compounds*, New Age International, New Delhi, 2000, pp. 14-23.
- [80] G. Vandermeulen, L. Rouxhet, A. Arien, M.E. Brewster, V. Preat, Encapsulation of amphotericin B in poly(ethylene glycol)-block-poly(epsilon-caprolactone-co-trimethylenecarbonate) polymeric micelles, *International journal of pharmaceutics*, 309 (2006) 234-240.
- [81] P.S. Darole, D.D. Hegde, H.A. Nair, Formulation and evaluation of microemulsion based delivery system for amphotericin B, *AAPS PharmSciTech*, 9 (2008) 122-128.
- [82] J. Barwicz, W. Gruszecki, I. Gruda, Spontaneous organization of amphotericin B in aqueous medium, *Journal of colloidal and interface science*, 158 (1993) 71-76.
- [83] W.I. Gruszecki, R. Luchowski, P. Wasko, Z. Gryczynski, I. Gryczynski, Molecular organization of polyene antibiotic amphotericin B studied by means of fluorescence technique, *Methods in molecular biology*, 875 (2012) 57-65.
- [84] D. Pavia, G. Lampman, G. Kriz, J. Vyvyan, *Introduction to spectroscopy*, 4th ed., Brooks/Cole Cengage Learning, Belmont, CA, USA, 2009.
- [85] R. Gómez, R. Murillo, Espectroscopía infrarroja. Disponible en: <http://sistemas.fciencias.unam.mx/~fam/Infrarroja.pdf>. [Fecha de acceso: 28/03/2013].

- [86] B. Reija, Tesis doctoral: Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes, Universidad Santiago de Compostela, 2007.
- [87] W.I. Gruszecki, R. Luchowski, M. Gagos, M. Arczewska, P. Sarkar, M. Herec, B. Mysliwa-Kurdziel, K. Strzalka, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, Molecular organization of antifungal antibiotic amphotericin B in lipid monolayers studied by means of Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, *Biophysical chemistry*, 143 (2009) 95-101.
- [88] A. Mesa-Arango, L. Scorzoni, O. Zaragoza, It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug, *Frontiers in microbiology*, 3 (2012) 1-10.
- [89] J. Brajtburg, W.G. Powderly, G.S. Kobayashi, G. Medoff, Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 34 (1990) 183-188.
- [90] S.C. Kinsky, Antibiotic interaction with model membranes, *Annual review of pharmacology*, 10 (1970) 119-142.
- [91] C.C. Hsueh, D.S. Feingold, Selective membrane toxicity of the polyene antibiotics: studies on lecithin membrane models (liposomes), *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 4 (1973) 309-315.
- [92] D.S. Palacios, I. Dailey, D.M. Siebert, B.C. Wilcock, M.D. Burke, Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (2011) 6733-6738.
- [93] A. Chattopadhyay, M. Jafurulla, A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis, *Biochemical and biophysical research communications*, 416 (2011) 7-12.
- [94] E.A. Romero, E. Valdivieso, B.E. Cohen, Formation of two different types of ion channels by amphotericin B in human erythrocyte membranes, *The Journal of membrane biology*, 230 (2009) 69-81.
- [95] B.E. Cohen, Amphotericin B membrane action: role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects, *The Journal of membrane biology*, 238 (2010) 1-20.
- [96] B.E. Cohen, A sequential mechanism for the formation of aqueous channels by amphotericin B in liposomes. The effect of sterols and phospholipid composition, *Biochim Biophys Acta*, 1108 (1992) 49-58.
- [97] R. Mouri, K. Konoki, N. Matsumori, T. Oishi, M. Murata, Complex formation of amphotericin B in sterol-containing membranes as evidenced by surface plasmon resonance, *Biochemistry*, 47 (2008) 7807-7815.
- [98] Y.Q. Zhang, S. Gamarra, G. Garcia-Effron, S. Park, D.S. Perlin, R. Rao, Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs, *PLoS pathogens*, 6 (2010) e1000939.
- [99] K.C. Gray, D.S. Palacios, I. Dailey, M.M. Endo, B.E. Uno, B.C. Wilcock, M.D. Burke, Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (2012) 2234-2239.
- [100] D.S. Palacios, T.M. Anderson, M.D. Burke, A post-PKS oxidation of the amphotericin B skeleton predicted to be critical for channel formation is not required for potent antifungal activity, *Journal of the American Chemical Society*, 129 (2007) 13804-13805.
- [101] Y.M. te Welscher, L. Jones, M.R. van Leeuwen, J. Dijksterhuis, B. de Kruijff, G. Eitzen, E. Breukink, Natamycin inhibits vacuole fusion at the priming phase via a



- specific interaction with ergosterol, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54 (2010) 2618-2625.
- [102] W. Chen, D. Chou, D. Feingold, Dissociation between ion permeability and the lethal action of polyene antibiotics on *Candida albicans*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 13 (1978) 914-917.
- [103] M.L. Sokol-Anderson, J. Brajtburg, G. Medoff, Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*, *The Journal of infectious diseases*, 154 (1986) 76-83.
- [104] E. Mowat, S. Lang, C. Williams, E. McCulloch, B. Jones, G. Ramage, Phase-dependent antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* developing multicellular filamentous biofilms, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 62 (2008) 1281-1284.
- [105] E.F. Gale, A.M. Johnson, D. Kerridge, T.Y. Koh, Factors affecting the changes in amphotericin sensitivity of *Candida albicans* during growth, *Journal of general microbiology*, 87 (1975) 20-36.
- [106] E.F. Gale, A.M. Johnson, D. Kerridge, The effect of aeration and metabolic inhibitors on resistance to amphotericin in starved cultures of *Candida albicans*, *Journal of general microbiology*, 99 (1977) 77-84.
- [107] T.T. Liu, R.E. Lee, K.S. Barker, R.E. Lee, L. Wei, R. Homayouni, P.D. Rogers, Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49 (2005) 2226-2236.
- [108] F. Sangalli-Leite, L. Scorzoni, A.C. Mesa-Arango, C. Casas, E. Herrero, M.J. Gianinni, J.L. Rodriguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, O. Zaragoza, Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst, *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 13 (2011) 457-467.
- [109] M.T. Lamy-Freund, V.F. Ferreira, S. Schreier, Mechanism of inactivation of the polyene antibiotic amphotericin B. Evidence for radical formation in the process of autooxidation, *The Journal of antibiotics*, 38 (1985) 753-757.
- [110] R.M. Haido, E. Barreto-Bergter, Amphotericin B-induced damage of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes, *Chemico-biological interactions*, 71 (1989) 91-103.
- [111] S. Shoham, C. Huang, J. Chen, D. Golenbock, S. Levitz, Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF- $\alpha$  release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule., *Journal of immunology*, 166 (2001) 4620-4626.
- [112] M. Mesa-Villanueva, P. Patiño, Receptores tipo Toll: entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro *Inmunología*, 25 (2006) 115-130.
- [113] S. Bellocchio, R. Gaziano, S. Bozza, G. Rossi, C. Montagnoli, K. Perruccio, M. Calvitti, L. Pitzurra, L. Romani, Liposomal amphotericin B activates antifungal resistance with reduced toxicity by diverting Toll-like receptor signalling from TLR-2 to TLR-4, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 55 (2005) 214-222.
- [114] C. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.*, 5th ed., Garland Sciences, New York, 2001.
- [115] K. Sau, S.S. Mambula, E. Latz, P. Henneke, D.T. Golenbock, S.M. Levitz, The antifungal drug amphotericin B promotes inflammatory cytokine release by a Toll-like receptor- and CD14-dependent mechanism, *The Journal of biological chemistry*, 278 (2003) 37561-37568.
- [116] C.V. Suschek, E. Bonmann, H. Kleinert, M. Wenzel, C. Mahotka, H. Kolb, U. Forstermann, C.D. Gerharz, V. Kolb-Bachofen, Amphotericin B severely affects expression and activity of the endothelial constitutive nitric oxide synthase involving altered mRNA stability, *British journal of pharmacology*, 131 (2000) 473-481.

- [117] E. Wilson, L. Thorson, D.P. Speert, Enhancement of macrophage superoxide anion production by amphotericin B, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35 (1991) 796-800.
- [118] J.H. Choi, E.Y. Kwon, C.M. Park, S.M. Choi, D.G. Lee, J.H. Yoo, W.S. Shin, D.A. Stevens, Immunomodulatory effects of antifungal agents on the response of human monocytic cells to *Aspergillus fumigatus* conidia, *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 48 (2010) 704-709.
- [119] T. Yano, Y. Itoh, E. Kawamura, A. Maeda, N. Egashira, M. Nishida, H. Kurose, R. Oishi, Amphotericin B-induced renal tubular cell injury is mediated by Na<sup>+</sup> Influx through ion-permeable pores and subsequent activation of mitogen-activated protein kinases and elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53 (2009) 1420-1426.
- [120] Y. Shadkchan, Y. Keisari, E. Segal, Cytokines in mice treated with amphotericin B-intralipid, *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 42 (2004) 123-128.
- [121] L. Romani, D.H. Howard, Mechanisms of resistance to fungal infections, *Current opinion in immunology*, 7 (1995) 517-523.
- [122] M. Simitopoulou, E. Roilides, J. Dotis, M. Dalakiouridou, F. Dudkova, E. Andreadou, T.J. Walsh, Differential expression of cytokines and chemokines in human monocytes induced by lipid formulations of amphotericin B, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49 (2005) 1397-1403.
- [123] AEMPS, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha técnica de la Fungizona. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/especialidad.do?metodo=verFichaWordPdf&codigo=46773&formato=pdf&formulario=FICHAS&file=ficha.pdf>. [Fecha de acceso: 26/03/2013].
- [124] P. Murray, K. Rosenthal, M. Pfaller, *Microbiología Médica*, 5ª ed., Elsevier, Barcelona, España, 2006.
- [125] R. Fernández, M. González, J. Fernández, F. Cepeda, Fármacos antifúngicos. Situación actual y pautas para su administración, *Clin Transl Oncol.*, 7 (2005) 377-388.
- [126] D. Ellis, Amphotericin B: spectrum and resistance, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 49 Suppl 1 (2002) 7-10.
- [127] F. Sabatelli, R. Patel, P.A. Mann, C.A. Mendrick, C.C. Norris, R. Hare, D. Loebenberg, T.A. Black, P.M. McNicholas, In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50 (2006) 2009-2015.
- [128] R.J. Duma, R. Finley, In vitro susceptibility of pathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* species to a variety of therapeutic agents, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 10 (1976) 370-376.
- [129] T. Hatabu, T. Takada, N. Taguchi, M. Suzuki, K. Sato, S. Kano, Potent plasmodicidal activity of a heat-induced reformulation of deoxycholate-amphotericin B (Fungizone) against *Plasmodium falciparum*, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49 (2005) 493-496.
- [130] A.N. Rain, T. Radzan, S. Sajiri, J.W. Mak, In vitro drug susceptibility of *Acanthamoeba castellanii* to chloroquine, ivermectin and fungizon, *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 27 (1996) 319-324.

- [131] K. Seifert, P. Escobar, S.L. Croft, In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65 (2010) 508-511.
- [132] V. Yardley, S.L. Croft, A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis, *Int J Antimicrob Agents*, 13 (2000) 243-248.
- [133] V. Yardley, S.L. Croft, Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41 (1997) 752-756.
- [134] T.J. Walsh, V. Petraitis, R. Petraitiene, A. Field-Ridley, D. Sutton, M. Ghannoum, T. Sein, R. Schaefe, J. Peter, J. Bacher, H. Casler, D. Armstrong, A. Espinel-Ingroff, M.G. Rinaldi, C.A. Lyman, Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B, *The Journal of infectious diseases*, 188 (2003) 305-319.
- [135] S.L. Kelly, D.C. Lamb, M. Taylor, A.J. Corran, B.C. Baldwin, W.G. Powderly, Resistance to amphotericin B associated with defective sterol  $\Delta 8 \rightarrow 7$  isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient, *FEMS microbiology letters*, 122 (1994) 39-42.
- [136] P.D. Khot, P.A. Suci, R.L. Miller, R.D. Nelson, B.J. Tyler, A small subpopulation of blastospores in *Candida albicans* biofilms exhibit resistance to amphotericin B associated with differential regulation of ergosterol and beta-1,6-glucan pathway genes, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50 (2006) 3708-3716.
- [137] S.L. Kelly, D.C. Lamb, D.E. Kelly, N.J. Manning, J. Loeffler, H. Hebart, U. Schumacher, H. Einsele, Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol  $\Delta 5,6$ -desaturation, *FEBS letters*, 400 (1997) 80-82.
- [138] J.A. Vazquez, M.T. Arganoza, D. Boikov, S. Yoon, J.D. Sobel, R.A. Akins, Stable phenotypic resistance of *Candida* species to amphotericin B conferred by preexposure to subinhibitory levels of azoles, *Journal of clinical microbiology*, 36 (1998) 2690-2695.
- [139] D.M. Arana, C. Nombela, J. Pla, Fluconazole at subinhibitory concentrations induces the oxidative- and nitrosative-responsive genes TRR1, GRE2 and YHB1, and enhances the resistance of *Candida albicans* to phagocytes, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65 (2010) 54-62.
- [140] M. Sokol-Anderson, J.E. Sligh, Jr., S. Elberg, J. Brajtburg, G.S. Kobayashi, G. Medoff, Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32 (1988) 702-705.
- [141] P. Geraghty, K. Kavanagh, Disruption of mitochondrial function in *Candida albicans* leads to reduced cellular ergosterol levels and elevated growth in the presence of amphotericin B, *Archives of microbiology*, 179 (2003) 295-300.
- [142] I. Bekersky, R.M. Fielding, D.E. Dressler, J.W. Lee, D.N. Buell, T.J. Walsh, Plasma protein binding of amphotericin B and pharmacokinetics of bound versus unbound amphotericin B after administration of intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46 (2002) 834-840.
- [143] R. Bellmann, Clinical pharmacokinetics of systemically administered antimycotics, *Current clinical pharmacology*, 2 (2007) 37-58.
- [144] T.K. Daneshmend, D.W. Warnock, Clinical pharmacokinetics of systemic antifungal drugs, *Clinical pharmacokinetics*, 8 (1983) 17-42.

- [145] I. Bekersky, R.M. Fielding, D.E. Dressler, J.W. Lee, D.N. Buell, T.J. Walsh, Pharmacokinetics, excretion, and mass balance of liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate in humans, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46 (2002) 828-833.
- [146] B. Dupont, Overview of the lipid formulations of amphotericin B, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 49 Suppl 1 (2002) 31-36.
- [147] V. Heinemann, D. Bosse, U. Jehn, B. Kahny, K. Wachholz, A. Debus, P. Scholz, H.J. Kolb, W. Wilmanns, Pharmacokinetics of liposomal amphotericin B (Ambisome) in critically ill patients, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41 (1997) 1275-1280.
- [148] A. Ayestaran, R.M. Lopez, J.B. Montoro, A. Estibalez, L. Pou, A. Julia, A. Lopez, B. Pascual, Pharmacokinetics of conventional formulation versus fat emulsion formulation of amphotericin B in a group of patients with neutropenia, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40 (1996) 609-612.
- [149] AEMPS, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha técnica del Abelcet. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/especialidad.do?metodo=verFichaWordPdf&codigo=60945&formato=pdf&formulario=FICHAS&file=ficha.pdf>. [Fecha de acceso: 26/03/2013].
- [150] A. Adedoyin, C.E. Swenson, L.E. Bolcsak, A. Hellmann, D. Radowska, G. Horwith, A.S. Janoff, R.A. Branch, A pharmacokinetic study of amphotericin B lipid complex injection (Abelcet) in patients with definite or probable systemic fungal infections, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44 (2000) 2900-2902.
- [151] T.J. Walsh, P. Whitcomb, S. Piscitelli, W.D. Figg, S. Hill, S.J. Chanock, P. Jarosinski, R. Gupta, P.A. Pizzo, Safety, tolerance, and pharmacokinetics of amphotericin B lipid complex in children with hepatosplenic candidiasis, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41 (1997) 1944-1948.
- [152] S.W. Sanders, K.N. Buchi, M.S. Goddard, J.K. Lang, K.G. Tolman, Single-dose pharmacokinetics and tolerance of a cholesteryl sulfate complex of amphotericin B administered to healthy volunteers, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35 (1991) 1029-1034.
- [153] T.J. Walsh, V. Yeldandi, M. McEvoy, C. Gonzalez, S. Chanock, A. Freifeld, N.I. Seibel, P.O. Whitcomb, P. Jarosinski, G. Boswell, I. Bekersky, A. Alak, D. Buell, J. Barret, W. Wilson, Safety, tolerance, and pharmacokinetics of a small unilamellar liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in neutropenic patients, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42 (1998) 2391-2398.
- [154] E.L. Romero, M.J. Morilla, Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question, *Expert opinion on drug delivery*, 5 (2008) 805-823.
- [155] G. Barrat, S. Bretagne, Optimizing efficacy of Amphotericin B through nanomodification, *International Journal of Nanomedicine* 2(2007) 301-313.
- [156] G. Storm, D. Crommelin, Liposomes: quo vadis?, *PSTT*, 1 (1998) 19-31.
- [157] S.P. Vyas, S. Gupta, Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification, *Int J Nanomedicine*, 1 (2006) 417-432.
- [158] S. Williamson, Production of Amphotericin B. Disponible en: <http://www.stephenwilliamson.com/Studies/AmpB.htm>. [Fecha de acceso: 26/03/2013].
- [159] R.M. Fielding, P.C. Smith, L.H. Wang, J. Porter, L.S. Guo, Comparative pharmacokinetics of amphotericin B after administration of a novel colloidal delivery system, ABCD, and a conventional formulation to rats, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35 (1991) 1208-1213.
- [160] DrugPatentWatch, Drug Patent Expirations and Intelligent Drug Patent Watch. Disponible en: <http://www.drugpatentwatch.com>. [Fecha de acceso: 29/03/2013].

- [161] S.S. Sanath, N.J. Gogtay, N.A. Kshirsagar, Post-marketing study to assess the safety, tolerability and effectiveness of Fungisome: an Indian liposomal amphotericin B preparation, *Journal of postgraduate medicine*, 51 Suppl 1 (2005) S58-63.
- [162] P.K. Sinha, A. Ranjan, V.P. Singh, V.N. Das, K. Pandey, N. Kumar, N. Verma, C.S. Lal, D. Sur, B. Manna, S.K. Bhattacharya, Visceral leishmaniasis (kala-azar)--the Bihar (India) perspective, *The Journal of infection*, 53 (2006) 60-64.
- [163] J.D. Cleary, S.W. Chapman, E. Swiatlo, R. Kramer, High purity amphotericin B, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60 (2007) 1331-1340.
- [164] R. Laniado-Laborin, M.N. Cabrales-Vargas, Amphotericin B: side effects and toxicity, *Revista iberoamericana de micologia*, 26 (2009) 223-227.
- [165] J.R. Wingard, Lipid formulations of amphotericins: are you a lump or a splitter?, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 35 (2002) 891-895.
- [166] A. Leenders, P. Reiss, P. Portegies, K. Clezy, W. Hop, J. Hoy, J. Borleffs, T. Allworth, R. Kauffmann, P. Jones, F. Kroon, H. Verbrugh, S. de Marie, Liposomal amphotericin B (AmBisome) compared with amphotericin B both followed by oral fluconazole in the treatment of AIDS associated cryptococcal meningitis., *AIDS*, 11 (1997) 1463-1471.
- [167] P. Johnson, L. Wheat, G. Cloud, M. Goldman, D. Lancaster, D. Bamberger, W. Powderly, R. Hafner, C. Kauffman, W. Dismukes, Safety and efficacy of liposomal amphotericin B compared with conventional amphotericin B for induction therapy of histoplasmosis in patients with AIDS., *Ann Intern Med*, 137 (2002) 105-109.
- [168] H.G. Prentice, I.M. Hann, R. Herbrecht, M. Aoun, S. Kvaloy, D. Catovsky, C.R. Pinkerton, S.A. Schey, F. Jacobs, A. Oakhill, R.F. Stevens, P.J. Darbyshire, B.E. Gibson, A randomized comparison of liposomal versus conventional amphotericin B for the treatment of pyrexia of unknown origin in neutropenic patients, *British journal of haematology*, 98 (1997) 711-718.
- [169] E. Anaissie, M. White, O. Ozun, Amphotericin B lipid complex versus amphotericin B for treatment of invasive candidiasis: a prospective, randomized, multicenter trial, *ASM Press, Washington, DC*, 1995.
- [170] R. Bowden, P. Chandrasekar, M.H. White, X. Li, L. Pietrelli, M. Gurwith, J.A. van Burik, M. Laverdiere, S. Safrin, J.R. Wingard, A double-blind, randomized, controlled trial of amphotericin B colloidal dispersion versus amphotericin B for treatment of invasive aspergillosis in immunocompromised patients, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 35 (2002) 359-366.
- [171] M.H. White, R.A. Bowden, E.S. Sandler, M.L. Graham, G.A. Noskin, J.R. Wingard, M. Goldman, J.A. van Burik, A. McCabe, J.S. Lin, M. Gurwith, C.B. Miller, Randomized, double-blind clinical trial of amphotericin B colloidal dispersion vs. amphotericin B in the empirical treatment of fever and neutropenia, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 27 (1998) 296-302.
- [172] M.P. Jadhav, V.M. Shinde, S. Chandrakala, F. Jijina, H. Menon, B. Arora, P.A. Kurkure, P.M. Parikh, N.A. Kshirsagar, A randomized comparative trial evaluating the safety and efficacy of liposomal amphotericin B (Fungisome) versus conventional amphotericin B in the empirical treatment of febrile neutropenia in India, *Indian journal of cancer*, 49 (2012) 107-113.
- [173] R.V. Fleming, H.M. Kantarjian, R. Husni, K. Rolston, J. Lim, I. Raad, S. Pierce, J. Cortes, E. Estey, Comparison of amphotericin B lipid complex (ABLC) vs. ambisome

in the treatment of suspected or documented fungal infections in patients with leukemia, *Leukemia & lymphoma*, 40 (2001) 511-520.

[174] J.R. Wingard, M.H. White, E. Anaissie, J. Raffalli, J. Goodman, A. Arrieta, L.A.A.C.S. Group, A randomized, double-blind comparative trial evaluating the safety of liposomal amphotericin B versus amphotericin B lipid complex in the empirical treatment of febrile neutropenia. L Amph/ABLC Collaborative Study Group, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 31 (2000) 1155-1163.

[175] S. Sundar, H. Mehta, A.V. Suresh, S.P. Singh, M. Rai, H.W. Murray, Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 38 (2004) 377-383.

[176] R. Carnero, Coste-efectividad del trataemito antifúngicocon AmBisome (anfotericina B liposómica), *Rev Esp Econ Salud*, 4 (2005) 172-177.

[177] e-Medimecum, Guía on-line de terapia farmacológica. Anfotericina B en formulaciones lipídicas. Disponible en: <http://www.medimecum.com/>. [Fecha de acceso: 30/03/2013].

[178] B. Brime, P. Frutos, P. Bringas, A. Nieto, M. Ballesteros, G. Frutos, Comparative pharmacokinetics and safety of a novel lyophilized amphotericin B lecithin-based oil-water microemulsion and amphotericin B deoxycholate in animal models, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 52 (2003) 103-109.

[179] B. Brime, M. Moreno, G. Frutos, M. Ballesteros, P. Frutos, Amphotericin B in oil-water lecithin-based microemulsions: formulation and toxicity evaluation, *Journal of pharmaceutical sciences*, 91 (2002) 1178-1185.

[180] P. Darole, D. Hegde, H. Nair, Formulation and evaluation of microemulsion based delivery system for amphotericin B, *AAPS PharmSciTech*, 9 (2008) 122-128.

[181] P. Angra, C. Oettinger, P.S. Balakrishna, M.J. D'Souza, Amphotericin B microspheres: a therapeutic approach to minimize toxicity while maintaining antifungal efficacy, *J Microencapsul.*, 26 (2009) 580-587.

[182] A.C. Amaral, A.L. Bocca, A.M. Ribeiro, J. Nunes, D.L. Peixoto, S. A.R., F.L. Primo, Z.G. Lacava, R. Bentes, R. Titze-de-Almeida, A.C. Tedesco, P.C. Morais, M.S. Felipe, Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 63 (2009) 526-533.

[183] H. Van de Ven, C. Paulussen, P.B. Feijens, A. Matheeußen, P. Rombaut, P. Kayaert, G. Van den Mooter, W. Weyenberg, P. Cos, L. Maes, A. Ludwig, PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: Potent in vitro and in vivo alternatives to Fungizone and AmBisome, *J Control Release*, 161 (2012) 795-803.

[184] N. Xu, J. Gu, Y. Zhu, H. Wen, Q. Ren, J. Chen, Efficacy of intravenous amphotericin B-polybutylcyanoacrylate nanoparticles against cryptococcal meningitis in mice, *Int J Nanomedicine*, 6 (2011) 905-913.

[185] S. Asthana, A.K. Jaiswal, P.K. Gupta, V.K. Pawar, A. Dube, M.K. Chourasia, Immunoadjuvant chemotherapy of visceral leishmaniasis in hamsters using amphotericin B-encapsulated nanoemulsion template-based chitosan nanocapsules, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57 (2013) 1714-1722.

[186] A. Gharib, Z. Faezizadeh, A.H. Mohammad, Preparation and antifungal activity of spray-dried amphotericin B-loaded nanospheres, *Daru*, 19 (2011) 351-355.

[187] M.S. Espuelas, P. Legrand, M.A. Campanero, M. Appel, M. Chéron, C. Gamazo, G. Barratt, J.M. Irache, Polymeric carriers for amphotericin B: in vitro activity, toxicity



and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 52 (2003) 419-427.

[188] K. Shao, J. Wu, Z. Chen, S. Huang, J. Li, L. Ye, J. Lou, L. Zhu, C. Jiang, A brain-vectored angiopep-2 based polymeric micelles for the treatment of intracranial fungal infection, *Biomaterials*, 33 (2012) 6898-6907.

[189] K. Shao, R. Huang, J. Li, L. Han, L. Ye, J. Lou, C. Jiang, Angiopep-2 modified PE-PEG based polymeric micelles for amphotericin B delivery targeted to the brain, *J Control Release*, 147 (2010) 118-126.

[190] M.L. Adams, D.R. Andes, G.S. Kwon, Amphotericin B encapsulated in micelles based on poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) derivatives exerts reduced in vitro hemolysis but maintains potent in vivo antifungal activity, *Biomacromolecules*, 4 (2003) 750-757.

[191] S.P. Hudson, R. Langer, G.R. Fink, D.S. Kohane, Injectable in situ cross-linking hydrogels for local antifungal therapy., *Biomaterials*, 31 (2012) 1444-1452.

[192] R.A. Pendleton, J.H.t. Holmes, Systemic absorption of amphotericin B with topical 5% mafenide acetate/amphotericin B solution for grafted burn wounds: is it clinically relevant?, *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*, 36 (2010) 38-41.

[193] I. Lifecare, Fungisome™ gel. Disponible en:

[http://www.lifecareinnovations.com/fungi\\_gel.html](http://www.lifecareinnovations.com/fungi_gel.html). [Fecha de acceso: 31/03/2013].

[194] C.M. Santos, R.B. de Oliveira, V.T. Arantes, L.R. Caldeira, M.C. de Oliveira, E.S. Egito, L.A. Ferreira, Amphotericin B-loaded nanocarriers for topical treatment of cutaneous leishmaniasis: development, characterization, and in vitro skin permeation studies, *Journal of biomedical nanotechnology*, 8 (2012) 322-329.

[195] C. Salerno, D.A. Chiappetta, A. Arechavala, S. Gorzalczany, S.L. Scioscia, C. Bregni, Lipid-based microtubes for topical delivery of Amphotericin B, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 107C (2013) 160-166.

[196] T. Loftsson, P. Jarho, M. Masson, T. Jarvinen, Cyclodextrins in drug delivery, *Expert opinion on drug delivery*, 2 (2005) 335-351.

[197] T. Loftsson, M. Masson, Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice, *International journal of pharmaceutics*, 225 (2001) 15-30.

[198] T. Loftsson, What are cyclodextrins? Disponible en :

[http://www.eurocdsoc.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=67](http://www.eurocdsoc.com/index.php?option=com_content&view=article&id=67).

[Fecha de acceso: 01/04/2013].

[199] T. Loftsson, Drug permeation through biomembranes: cyclodextrins and the unstirred water layer, *Die Pharmazie*, 67 (2012) 363-370.

[200] V.J. Stella, Q. He, Cyclodextrins, *Toxicologic pathology*, 36 (2008) 30-42.

[201] ISP, Product guide cyclodextrins. Disponible en:

<http://www.anshulindia.com/pdfs/Cyclodextrins.pdf>. [Fecha de acceso: 01/04/2013].

[202] J.J. Torrado, D.R. Serrano, I.F. Uchegbu, The oral delivery of amphotericin B, *Therapeutic delivery*, 4 (2013) 9-12.

[203] M.S. Ching, K. Raymond, R.W. Bury, M.L. Mashford, D.J. Morgan, Absorption of orally administered amphotericin B lozenges, *British journal of clinical pharmacology*, 16 (1983) 106-108.

[204] C. Halde, V.D. Newcomer, E.T. Wright, T.H. Sternberg, An evaluation of amphotericin B in vitro and in vivo in mice against *Coccidioides immitis* and *Candida albicans*, and preliminary observations concerning the administration of amphotericin B to man, *The Journal of investigative dermatology*, 28 (1957) 217-231; discussion, 231-212.

- [205] D.B. Louria, Some aspects of the absorption, distribution, and excretion of amphotericin B in man, *Antibiotic medicine & clinical therapy*, 5 (1958) 295-301.
- [206] H.M. Kravetz, V.T. Andriole, M.A. Huber, J.P. Utz, Oral administration of solubilized amphotericin B, *The New England journal of medicine*, 265 (1961) 183-184.
- [207] G. Robbie, T.C. Wu, W.L. Chiou, Poor and unusually prolonged oral absorption of amphotericin B in rats, *Pharmaceutical research*, 16 (1999) 455-458.
- [208] V. Risovic, M. Boyd, E. Choo, K.M. Wasan, Effects of lipid-based oral formulations on plasma and tissue amphotericin B concentrations and renal toxicity in male rats, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47 (2003) 3339-3342.
- [209] J.L. Italia, M.M. Yahya, D. Singh, M.N. Ravi Kumar, Biodegradable nanoparticles improve oral bioavailability of amphotericin B and show reduced nephrotoxicity compared to intravenous Fungizone, *Pharmaceutical research*, 26 (2009) 1324-1331.
- [210] P. Gershkovich, E.K. Wasan, M. Lin, O. Sivak, C.G. Leon, J.G. Clement, K.M. Wasan, Pharmacokinetics and biodistribution of amphotericin B in rats following oral administration in a novel lipid-based formulation, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 64 (2009) 101-108.
- [211] P.A. Patel, V.B. Patravale, AmbiOnp: solid lipid nanoparticles of amphotericin B for oral administration, *Journal of biomedical nanotechnology*, 7 (2011) 632-639.
- [212] L. Zarif, T. Jin, I. Segarra, R. Mannino, Novel hydrogel isolated cochleate formulations, process of preparation and their use for the delivery of biologically relevant molecules, in, 2007, pp. 27.
- [213] P. Gershkovich, O. Sivak, E.K. Wasan, A.B. Magil, D. Owen, J.G. Clement, K.M. Wasan, Biodistribution and tissue toxicity of amphotericin B in mice following multiple dose administration of a novel oral lipid-based formulation (iCo-009), *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65 (2010) 2610-2613.
- [214] P. Gershkovich, E.K. Wasan, O. Sivak, R. Li, X. Zhu, K.A. Werbovetz, R.R. Tidwell, J.G. Clement, S.J. Thornton, K.M. Wasan, Visceral leishmaniasis affects liver and spleen concentrations of amphotericin B following administration to mice, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65 (2010) 535-537.
- [215] O. Sivak, P. Gershkovich, M. Lin, E.K. Wasan, J. Zhao, D. Owen, J.G. Clement, K.M. Wasan, Tropically stable novel oral lipid formulation of amphotericin B (iCo-010): biodistribution and toxicity in a mouse model, *Lipids in health and disease*, 10 (2011) 135.
- [216] T. Ramasamy, U. Khandasamy, R. Hinabindhu, K. Kona, Nanocochleate – A New Drug Delivery System, *FABAD J. Pharm. Sci*, 34 (2009) 91-101.
- [217] R. Santangelo, P. Paderu, G. Delmas, Z.W. Chen, R. Mannino, L. Zarif, D.S. Perlin, Efficacy of oral cochleate-amphotericin B in a mouse model of systemic candidiasis, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44 (2000) 2356-2360.
- [218] E.K. Wasan, K. Bartlett, P. Gershkovich, O. Sivak, B. Banno, Z. Wong, J. Gagnon, B. Gates, C.G. Leon, K.M. Wasan, Development and characterization of oral lipid-based amphotericin B formulations with enhanced drug solubility, stability and antifungal activity in rats infected with *Aspergillus fumigatus* or *Candida albicans*, *International journal of pharmaceutics*, 372 (2009) 76-84.
- [219] K.M. Wasan, E.K. Wasan, P. Gershkovich, X. Zhu, R.R. Tidwell, K.A. Werbovetz, J.G. Clement, S.J. Thornton, Highly effective oral amphotericin B formulation against murine visceral leishmaniasis, *The Journal of infectious diseases*, 200 (2009) 357-360.



- [220] V. Risovic, M. Rosland, O. Sivak, K.M. Wasan, K. Bartlett, Assessing the antifungal activity of a new oral lipid-based amphotericin B formulation following administration to rats infected with *Aspergillus fumigatus*, *Drug development and industrial pharmacy*, 33 (2007) 703-707.
- [221] G. Delmas, S. Park, Z.W. Chen, F. Tan, R. Kashiwazaki, L. Zarif, D.S. Perlin, Efficacy of orally delivered cochleates containing amphotericin B in a murine model of aspergillosis, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46 (2002) 2704-2707.
- [222] T. Sonia, C. Charma, Chitosan and Its Derivatives for Drug Delivery Perspective, *Adv. Polym. Sci.*, 243 (2011) 23-54.
- [223] M. Werle, H. Takeuchi, A. Bernkop-Schnurch, Modified chitosans for oral drug delivery, *Journal of pharmaceutical sciences*, 98 (2009) 1643-1656.
- [224] S. Hirano, Chitin biotechnology applications, *Biotechnology annual review*, 2 (1996) 237-258.
- [225] K. Bowman, K.W. Leong, Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery, *Int J Nanomedicine*, 1 (2006) 117-128.
- [226] A.K. Singla, M. Chawla, Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects--an update, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 53 (2001) 1047-1067.
- [227] N. Bhattarai, J. Gunn, M. Zhang, Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery, *Advanced drug delivery reviews*, 62 (2010) 83-99.
- [228] I. Aranaz, R. Harris, A. Heras, Chitosan Amphiphilic Derivatives. Chemistry and Applications, *Curr. Org. Chem.*, 14 (2010) 308-330.
- [229] X. Qu, V.V. Khutoryanskiy, A. Stewart, S. Rahman, B. Papahadjopoulos-Sternberg, C. Dufes, D. McCarthy, C.G. Wilson, R. Lyons, K.C. Carter, A. Schatzlein, I.F. Uchegbu, Carbohydrate-based micelle clusters which enhance hydrophobic drug bioavailability by up to 1 order of magnitude, *Biomacromolecules*, 7 (2006) 3452-3459.
- [230] I.F. Uchegbu, L. Sadiq, M. Arastoo, A.I. Gray, W. Wang, R.D. Waigh, A.G. Schatzlein, Quaternary ammonium palmitoyl glycol chitosan--a new polysoap for drug delivery, *International journal of pharmaceutics*, 224 (2001) 185-199.
- [231] R. Drew, Potential role of aerosolized amphotericin B formulations in the prevention and adjunctive treatment of invasive fungal infections, *Int J Antimicrob Agents*, 27 Suppl 1 (2006) 36-44.
- [232] E.J. Ruijgrok, A.G. Vulto, E.W. Van Etten, Efficacy of aerosolized amphotericin B desoxycholate and liposomal amphotericin B in the treatment of invasive pulmonary aspergillosis in severely immunocompromised rats, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48 (2001) 89-95.
- [233] C.E. Cicogna, M.H. White, E.M. Bernard, T. Ishimura, M. Sun, W.P. Tong, D. Armstrong, Efficacy of prophylactic aerosol amphotericin B lipid complex in a rat model of pulmonary aspergillosis, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41 (1997) 259-261.
- [234] K. Gilani, E. Moazeni, T. Ramezanli, M. Amini, M.R. Fazeli, H. Jamalifar, Development of respirable nanomicelle carriers for delivery of amphotericin B by jet nebulization, *Journal of pharmaceutical sciences*, 100 (2011) 252-259.
- [235] B.L. Burgess, G. Cavigiolio, M.V. Fannucchi, B. Illek, T.M. Forte, M.N. Oda, A phospholipid-apolipoprotein A-I nanoparticle containing amphotericin B as a drug delivery platform with cell membrane protective properties, *International journal of pharmaceutics*, 399 (2010) 148-155.
- [236] F.A. Ebbens, G.K. Scadding, L. Badia, P.W. Hellings, M. Jorissen, J. Mullol, A. Cardesin, C. Bachert, T.P. van Zele, M.G. Dijkgraaf, V. Lund, W.J. Fokkens, Amphotericin B nasal lavages: not a solution for patients with chronic rhinosinusitis, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 118 (2006) 1149-1156.

- [237] J.U. Ponikau, D.A. Sherris, A. Weaver, H. Kita, Treatment of chronic rhinosinusitis with intranasal amphotericin B: a randomized, placebo-controlled, double-blind pilot trial, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 115 (2005) 125-131.
- [238] S. Isaacs, S. Fakhri, A. Luong, M.J. Citardi, A meta-analysis of topical amphotericin B for the treatment of chronic rhinosinusitis, *International forum of allergy & rhinology*, 1 (2011) 250-254.
- [239] WHO, Leishmaniasis. Burden of disease. Disponible en: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. [Fecha de acceso: 04/04/2013].
- [240] J. Alvar, I.D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. den Boer, Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence, *PLoS One*, 7 (2012) e35671.
- [241] J. Kubar, K. Fragaki, Recombinant DNA-derived leishmania proteins: from the laboratory to the field, *Lancet Infect Dis*, 5 (2005) 107-114.
- [242] SaludMadrid, Informe del estado de salud de la población de la Comunidad de Madrid. Disponible en: <http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-disposition&blobheadername2=cadena&blobheadervalue1=filename%3DINFORME2012.pdf&blobheadervalue2=language%3Des%26site%3DPortalSalud&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1352810473585&ssbinary=true>. [Fecha de acceso: 04/04/2013].
- [243] J. Moreno, J. Alvar, Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model, *Trends Parasitol*, 18 (2002) 399-405.
- [244] G. Baneth, A.F. Koutinas, L. Solano-Gallego, P. Bourdeau, L. Ferrer, Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one, *Trends Parasitol.*, 24 (2008) 324-330.
- [245] L. Solano-Gallego, G. Miró, A. Koutinas, L. Cardoso, M.G. Pennisi, L. Ferrer, P. Bourdeau, G. Oliva, G. Baneth, LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis, *Parasit Vectors*, 4 (2011) 1-16.
- [246] CDC, Centers for Disease control and Prevention. Leishmaniasis. Disponible en: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. [Fecha de acceso: 04/04/2013].
- [247] D. Sánchez-Saldaña, E. Sáenz-Anduaga, J. Pancorbo-Mendoza, R. Zegarra-Del-Carpio, N. Garcés-Velasco, A. Regis-Roggero, Leishmaniasis, *Dermatologia peruana*, 14 (2004) 82-98.
- [248] P.A. Bates, M.E. Rogers, New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania, *Curr Mol Med*, 4 (2004) 601-609.
- [249] L.R. Hall, R.G. Titus, Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of Leishmania major and nitric oxide production, *Hall LR, Titus RG.*, 155 (1995) 3501-3506.
- [250] WellcomeTrust, Wellcome Trust Animation: Leishmaniasis - human stages. Disponible en: <http://www.wellcome.ac.uk/Education-resources/Education-and-learning/animations/protozoans/wtdv027428.htm>. [Fecha de acceso: 04/04/2013].
- [251] M.A. Vannier-Santos, A. Martiny, W. de Souza, Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading, *Curr Pharm Des*, 8 (2002) 297-318.
- [252] L. Vásquez, D. Sierra, E. Rojas, Transmission mechanisms of Leishmaniasis, *Rev. Soc. Ven. Microbiol*, 22 (2002).
- [253] F.Y. Liew, C.A. O'Donnell, Immunology of leishmaniasis, *Adv Parasitol.*, 32 (1993) 161-259.

- [254] E. Mougneau, F. Bihl, N. Glaichenhaus, Cell biology and immunology of Leishmania, *Immunol Rev.*, 240 (2011) 286-296.
- [255] J. Alvar, Las leishmaniasis: de la biología al control, 2ª ed., Laboratorios Intervet S. A., Salamanca, Spain, 2001.
- [256] R. Lopez, L. R., M. Novales, P.J. Ginel, E. Martin, J.M. Molleda, Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis., *Zentralbl Veterinarmed B*, 43 (1996) 469-474.
- [257] J.E. Valladares, R. Ruiz De Gopegui, C. Riera, J. Alberola, M. Gállego, Y. Espada, M. Portús, M. Arboix, Study of haemostatic disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs, *Res Vet Sci.*, 64 (1998) 195-198.
- [258] WHO, Visceral Leishmaniasis. Disponible en: [http://www.who.int/leishmaniasis/visceral\\_leishmaniasis/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/visceral_leishmaniasis/en/). [Fecha de acceso: 04/04/2013].
- [259] F. Chappuis, S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R.W. Peeling, J. Alvar, M. Boelaert, Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?, *Nat Rev Microbiol*, 5 (2007) 873-882.
- [260] WHO, Cutaneous leishmaniasis, Why are you neglecting me? Disponible en: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO\\_CDS\\_NTD\\_IDM\\_2007.3\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_CDS_NTD_IDM_2007.3_eng.pdf). [Fecha de acceso: 05/04/2013].
- [261] WHO, The disease and its epidemiology: cutaneous forms. Disponible en: [http://www.who.int/leishmaniasis/disease\\_epidemiology/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/). [Fecha de acceso: 05/04/2013].
- [262] L.H. Freitas-Junior, E. Chatelainb, H.A. Kima, J. Siqueira-Neto, Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it?, *Int J Parasitol Drugs Drug Resis*, 2 (2012) 11-19.
- [263] J. Alvar, S. Croft, P. Olliaro, Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis., *Adv Parasitol*, 61 (2006) 223-274.
- [264] CDC, Drugs for Parasitic Infections. Disponible en: [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/PDF\\_Files/MedLetter/Leishmania.pdf](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/PDF_Files/MedLetter/Leishmania.pdf). [Fecha de acceso: 05/04/2013].
- [265] S. Sundar, P.L. Olliaro, Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management, *Ther Clin Risk Manag*, 3 (2007) 733-740.
- [266] P. Roy, S. Das, R.G. Auddy, A. Mukherjee, Biological targeting and drug delivery in control of Leishmaniasis, *Journal of Cell and Animal Biology*, 6 (2012) 73-87.
- [267] WHO, Costs of medicines in current use for the treatment of leishmaniasis. Disponible en: [http://www.who.int/leishmaniasis/research/978\\_92\\_4\\_12\\_949\\_6\\_Annex6.pdf](http://www.who.int/leishmaniasis/research/978_92_4_12_949_6_Annex6.pdf). [Fecha de acceso: 05/04/2013].
- [268] G. Miro, R. Molina, La leishmaniosis canina: manejo clínico y situación actual en España, Ediciones Bayer Health Care, 2006.
- [269] R. Nagill, S. Kaur, Vaccine candidates for leishmaniasis: a review, *Int Immunopharmacol*, 11 (2011) 1464-1488.
- [270] EMEA, CaniLeish. Vacuna canina adyuvada contra la Leishmania infantum. Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/veterinary/002232/WC500104955.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/veterinary/002232/WC500104955.pdf). [Fecha de acceso: 06/04/13].
- [271] R.V. Fleming, T.J. Walsh, E.J. Anaissie, Emerging and less common fungal pathogens, *Infect Dis Clin North Am*, 16 (2002) 915-933.

- [272] D.H. Van Thiel, M. George, C.M. Moore, Fungal Infections: Their Diagnosis and Treatment in Transplant Recipients, *Int J Hepatol*, (2012) 1-19.
- [273] K.H. Abu-Elteen, M.A. Hamad, Changing Epidemiology of Classical and Emerging Human Fungal Infections: A Review, *JJBS*, 5 (2012) 215-230.
- [274] G. Maschmeyer, A. Haas, O.A. Cornely, Invasive aspergillosis: epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients, *Drugs*, 67 (2007) 1567-1601.
- [275] A.M. Tortorano, C. Kibbler, J. Peman, H. Bernhardt, L. Klingspor, G. R., Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance, *Int J Antimicrob Agent*, 27 (2006) 359-366.
- [276] M.A. Pfaller, P.G. Pappas, J.R. Wingard, Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 43 (2006) S3-14.
- [277] L.S. Wilson, C.M. Reyes, M. Stolpman, J. Speckman, K. Allen, J. Beney, The direct cost and incidence of systemic fungal infections, *Value in Health*, 5 (2002) 26-34.
- [278] B. Havlickova, V.A. Czaika, M. Friedrich, Epidemiological trends in skin mycoses worldwide, *Mycoses*, 51 (2008) 2-15.
- [279] V. Crespo-Erchiga, V. Delgado-Florencio, Micosis cutáneas, *Med Clin (Barc)*, 125 (2005) 467-474.
- [280] I.P. Kaur, C. Rana, H. Singh, Development of effective ocular preparations of antifungal agents, *J Ocul Pharmacol Ther*, 24 (2010) 381-393.
- [281] J.P. Whitcher, M. Srinivasan, M.P. Upadhyay, Corneal blindness: A global perspective, *Bull World Health Organ*, 79 (2001) 214-221.
- [282] P.A. Thomas, Current Perspectives on Ophthalmic Mycoses, *Clinical microbiology reviews*, 16 (2003) 730-797.
- [283] R. Mehta, G. Lopez-Berestein, R. Hopfer, K. Mills, R.L. Juliano, Liposomal amphotericin B is toxic to fungal cells but not to mammalian cells, *Biochim Biophys Acta*, 770 (1984) 230-234.
- [284] M.L. Adams, G.S. Kwon, Relative aggregation state and hemolytic activity of amphotericin B encapsulated by poly(ethylene oxide)-block-poly(N-hexyl-L-aspartamide)-acyl conjugate micelles: effects of acyl chain length, *J Control Release*, 87 (2003) 23-32.
- [285] D.F. Driscoll, Stability and compatibility assessment techniques for total parenteral nutrition admixtures: setting the bar according to pharmacopeial standards, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 8 (2005) 297-303.
- [286] R.A. Petros, J.M. DeSimone, Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications, *Nature Reviews Drug Discovery*, 9 (2010) 615-627.
- [287] B.K. Yoo, M.A. Jalil Miah, E.S. Lee, K. Han, Reduced renal toxicity of nanoparticulate amphotericin B micelles prepared with partially benzylated poly-L-aspartic acid, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 29 (2006) 1700-1705.
- [288] A. Swami, A. Shi, S. Gadde, A. Votruba, N. Kolishetti, O. Farokhzad, Chapter 2: Nanoparticles for Targeted and Temporally Controlled Drug Delivery, in: S. Svenson, R. Prud'homme (Eds.) *Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery Applications: Imaging, Targeting, and Delivery*, Nanostructure Science and Technology, Springer Science+Business Media, LLC, New York, 2012, pp. 9-29.
- [289] P. Decuzzi, F. Causa, M. Ferrari, P.A. Netti, The effective dispersion of nanovectors within the tumor microvasculature, *Ann Biomed Eng*, 34 (2006) 633-641.
- [290] M. Yokoyama, Drug targeting with nano-sized carrier systems, *J Artif Organs*, 8 (2005) 77-84.

- [291] M.E. Davis, M.E. Brewster, Cyclodextrins-based pharmaceuticals: past, present and future, *Nat Rev Drug Discov*, 3 (2004) 1023-1035.
- [292] T. Loftssonaa, T. Järvinen, Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery, *Advanced drug delivery reviews*, 36 (1999) 59-79.
- [293] J.L. Garcia, Nuevos contactantes en Alergología, *Alergol Inmunol Clin*, 17 (2002) 111-115.
- [294] M.Q. Rahman, D. Tejwani, J.A. Wilson, I. Butcher, K. Ramaesh, Microbial contamination of preservative free eye drops in multiple application containers, *Br J Ophthalmol*, 90 (2006) 139-141.
- [295] Y. Xu, G. Pang, D. Zhao, C. Gao, L. Zhou, S. Sun, B. Wang, In Vitro Activity of Thimerosal against Ocular Pathogenic Fungi, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54 (2010) 536-539.
- [296] C.A. Lopez, A.H. de Vries, S.J. Marrink, Molecular mechanism of cyclodextrin mediated cholesterol extraction, *PLoS Comput Biol*, 7 (2011) p. e1002020.
- [297] I. Puskas, F. Csempesz, Influence of cyclodextrins on the physical stability of DPPC-liposomes, *Biointerfaces*, 58 (2007) 218-224.
- [298] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced drug delivery reviews*, 46 (2001) 3-26.
- [299] J. Ishizaki, S. Ito, M. Jin, T. Shimada, T. Ishigaki, Y. Harasawa, K. Yokogawa, A. Takami, S. Nakao, K. Miyamoto, Mechanism of decrease of oral bioavailability of cyclosporin A during immunotherapy upon coadministration of amphotericin B, *Biopharm Drug Dispos*, 29 (2008) 195-203.
- [300] C. He, Y. L., C. Tang, C. Yin, Size-dependent absorption mechanism of polymeric nanoparticles for oral delivery of protein drugs, *Biomaterials*, 33 (2012) 8569-8578.
- [301] G.G. Liversidge, K.C. Cundy, Particle-Size Reduction for Improvement of Oral Bioavailability of Hydrophobic Drugs .1. Absolute Oral Bioavailability of Nanocrystalline Danazol in Beagle Dogs, *International journal of pharmaceuticals*, 125 (1995) 91-97.
- [302] D.T. O'Hagan, The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery, *J Anat*, 189 (1996) 477-482.
- [303] L.M. Ensign, R. Cone, J. Hanes, Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers, *Advanced drug delivery reviews*, 64 (2012) 557-570.
- [304] N. Hussain, V. Jaitley, A.T. Florence, Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics, *Advanced drug delivery reviews*, 50 (2001) 107-142.
- [305] K. Sagawa, F. Li, R. Liese, S. Sutton, Fed and Fasted Gastric pH and Gastric Residence Time in Conscious Beagle Dogs, *J. Pharm. Sci*, 98 (2009) 2494-2500.
- [306] E.L. McConnell, A.W. Basit, S. Murdan, Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 60 (2008) 63-70.
- [307] B. Davies, T. Morris, Physiological parameters in laboratory animals and human, *Pharmaceutical research*, 10 (1993) 1903-1905.
- [308] T.T. Kararli, Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals, *Biopharmaceutics & drug disposition*, 16 (1995) 351-380.

[309] N.L. Trevaskis, W.N. Charman, C.J.H. Porter, Lipid-based delivery systems and intestinal lymphatic drug transport: A mechanistic update, *Advanced Drug Delivery Review*, 60 (2008) 702-716.

Distribución prolongada circulación  
AmBisome Fungizona **anfotericina B** poli  
i agregada coste efectiva y segura fármac  
o alternativo tamaño **7. Anexo I**

ciclodextrinas chitosán modificado **anf  
otericina** poli agregada tamaño de partí  
cula absorción oral toxicidad hemolítica  
bi distribución prolongada circulación  
n plasmática amplio volumen de distrib  
ución tamaño de partícula **anfotericina**  
B poli agregados sistema de retículo endo  
telio toxicidad hemolítica macrófagos *L  
eishmania* **AmB** Beagle shipotensión efi  
cacia chitosán modificado baja solubilidad  
adecuada bi disponibilidad por vía oral  
excipientes ciclodextrinas desoxicolato  
sódico **amphotericin B** canacidad anti





## 9. ANEXO I

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(1) Número de publicación: **2 387 440**

(2) Número de solicitud: 201001230

(5) Int. Cl.:

**A61K 31/7048** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61K 47/40** (2006.01)

**A61K 9/06** (2006.01)

**A61K 9/08** (2006.01)

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación: **27.09.2010**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2012**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**21.09.2012**

(71) Solicitante/s:  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
AV. SENECA, 2  
28040 MADRID, ES**

(72) Inventor/es:  
**TORRADO DURAN, JUAN JOSE;  
RUIZ SALDAÑA, HELGA KARINA;  
SERRANO LOPEZ, DOLORES REMEDIOS;  
MOLERO MARTIN-PORTUGUES, GLORIA;  
NOMBELA CANO, CESAR;  
BOLAS FERNANDEZ, FRANCISCO;  
DEA AYUELA, MARIA AUXILIADORA;  
BILBAO RAMOS, PABLO ESTANISLAO y  
VEGAS SANCHEZ, MARIA DEL CARMEN**

(74) Agente/Representante:  
**No consta**

(54) Título: **FORMULACIONES TOPICAS DE ANFOTERICINA B Y METODO DE OBTENCION**

(57) Resumen:

La invención se refiere a la preparación de nuevas formulaciones de anfotericina B de administración por vía tópica. En dichas formulaciones, la anfotericina B se encuentra formando un complejo con ciclodextrina. La poca afinidad de la anfotericina B por la ciclodextrina provoca la liberación de la mayor parte del antifúngico tras la administración de la formulación, ocasionando un aumento del efecto farmacológico de la anfotericina B gracias al cual ésta manifiesta acción antiparasitaria (antileishmaniosis) además de la acción antimicótica (cutánea, mucocutánea y superficial), principal indicación para la que se prescribe actualmente la anfotericina B. Para la preparación de estas formulaciones se utiliza una combinación de excipientes (además de la ciclodextrina que actúa como solubilizante), tales como viscosizantes, emulsificantes y excipientes grasos. En la presente invención se describe la preparación de formulaciones tópicas de anfotericina B, presentando cada o una de ellas una forma farmacéutica diferente: gel, crema, pomada y colirio.

ES 2 387 440 A1

ES 2 387 440 A1

## DESCRIPCIÓN

### Título

### FORMULACIONES TÓPICAS DE ANFOTERICINA B Y MÉTODO DE OBTENCIÓN

5

### Sector de la Técnica

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de la fabricación de preparaciones farmacéuticas. De forma más concreta, la invención se refiere a la  
10 preparación y obtención de nuevas composiciones de anfotericina B de administración por vía tópica, y su utilización en el tratamiento y prevención de micosis superficiales, cutáneas y mucocutáneas, así como para el tratamiento de leishmaniosis.

### Estado de la Técnica

15

La anfotericina B fue descubierta a mediados de los años 50 del siglo pasado por la empresa Squibb, que posteriormente la comercializó en forma de suspensión de administración intravenosa con el nombre comercial Fungizona® (anfotericina B desoxicolato). Esta formulación todavía está en el mercado y aunque en algunos  
20 países, por ejemplo España, se ha dejado de comercializar sustituyéndola por otras formulaciones menos tóxicas, como liposomas y complejos lipídicos de anfotericina B, Fungizona® sigue siendo todavía la formulación de referencia de este antifúngico.

La anfotericina B interactúa directamente con el ergosterol de la membrana celular  
25 fúngica pero no interfiere con la síntesis de la membrana sino que la desestabiliza, facilitando la formación de canales con la pérdida consecuente de iones y componentes celulares produciendo así la muerte celular. En gran parte, esta acción se debe a su peculiar estructura química caracterizada por presentar una doble naturaleza hidrófila y lipófila. Esta propiedad, junto con el comportamiento anfótero (tiene  
30 grupos ácido y base) que da nombre a la molécula (anfotericina), facilita su incorporación a las membranas celulares induciendo la desestabilización de las mismas. Su mayor afinidad por los esteroides de la membrana celular fúngica, que por

ES 2 387 440 A1

el colesterol de la célula animal, explica que la anfotericina B resulte más tóxica para el patógeno que para el hospedador, a pesar de lo cual resulta ser un antifúngico de toxicidad muy elevada.

- 5 La peculiar estructura química de este antifúngico es asimismo responsable de las importantes dificultades para su solubilización, condicionando así la preparación de formulaciones de anfotericina B. Sólo por su deficiente solubilidad se justifica, con carácter excepcional, la utilización de suspensiones de administración intravenosa.
- 10 Asimismo, su escasa afinidad por el agua es responsable de la tendencia a la formación de agregados moleculares cuando se dispersa en un medio acuoso. Se han descrito varios estados de agregación de anfotericina B con diferente actividad y toxicidad. De forma resumida éstos serían tres: monomérico, dimérico y poliagregado. La forma más utilizada en terapéutica es la dimérica, obtenida por mezcla de
- 15 anfotericina B y desoxicolato sódico junto con un cambio de pH (Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP y Torrado-Santiago S. "Amphotericin B formulations and drug targeting", *J. Pharm. Sci.* 2008: 97, 2405-2425). A pesar de las limitaciones para su utilización a causa de la toxicidad, tras muchos años desde su lanzamiento al mercado la anfotericina B sigue siendo considerada como un antifúngico de primera elección
- 20 en muchos casos, tanto por su amplio espectro como, sobre todo, porque su uso no ha generado resistencias clínicas relevantes.

Desde el descubrimiento de la anfotericina B han sido varias las formulaciones de la misma que se han comercializado en todo el mundo. La primera formulación que se

25 comercializó y la que recibe el nombre de anfotericina B convencional es:

Anfotericina B desoxicolato (abreviadamente, AMB desoxicolato) (comercializado bajo el nombre de Fungizona®): se trata de un complejo coloidal de anfotericina B con desoxicolato sódico. Su forma farmacéutica es la de polvo liofilizado estéril para

30 reconstituirse y la vía de administración es la intravenosa, aunque también existe presentación para suspensión oral.

ES 2 387 440 A1

Debido a los problemas encontrados en esta formulación (principalmente, la nefrotoxicidad), y dado que la anfotericina B había demostrado una gran eficacia, se propusieron formulaciones lipídicas de la misma como alternativa al tratamiento clásico.

5

Estas formulaciones lipídicas han demostrado ser menos tóxicas que la anfotericina B desoxicolato en varios estudios experimentales manteniendo el mismo espectro antifúngico, lo que permite una dosificación más alta y, con ello, aumentar el índice terapéutico.

10

Las formulaciones lipídicas que han llegado al mercado son:

15 Anfotericina B complejo lipídico (comercializado bajo el nombre de Abelcet®): se trata de un complejo de anfotericina B con dos fosfolípidos: L- $\alpha$ -dimiristoilfosfatidilcolina (abreviadamente, DMPC), L- $\alpha$ -dimiristoilfosfatidilglicerol (en forma de sales de sodio y amonio) (abreviadamente, DMPG). Su forma farmacéutica es la de un concentrado para suspensión y la vía de administración es la perfusión.

20 Anfotericina liposomal (comercializado bajo el nombre de AmBisome®): se trata de una formulación farmacéutica que comprende anfotericina B encapsulada en la bicapa de liposomas. La forma farmacéutica es la de un liofilizado y la vía de administración es por infusión intravenosa.

25 Anfotericina B dispersión coloidal (comercializado bajo el nombre de Amphotec® o Amphocil®): se trata de un complejo de anfotericina B con sulfato sódico de colesterilo. La forma farmacéutica es la de liofilizado para reconstitución y la vía de administración es por infusión intravenosa.

30 Otra formulación farmacéutica que se lanzó al mercado (aprobada en España en el año 1967) comprendía anfotericina B combinada con gramicidina, neomicina y triamcinolona y en esta ocasión la formulación se presentaba en forma de pomada

ES 2 387 440 A1

(Catálogo de Especialidades Farmacéuticas del Consejo General de Colegios Oficiales de farmacéuticos, 1998) (comercializada bajo el nombre de Trigon®). Sin embargo, una combinación de cuatro componentes activos en una misma formulación (polifármaco) está actualmente desaconsejada ya que aumenta el riesgo de resistencias y efectos adversos. Esta formulación farmacéutica se dejó de comercializar en España a finales del siglo pasado.

Por otra parte, tal y como se ha comentado anteriormente en la presente invención, los principales inconvenientes que plantea la anfotericina B para el desarrollo de formulaciones farmacéuticas son su escasa solubilidad en medio acuoso y su deficiente estabilidad física y química. Por este motivo, paralelamente a la investigación llevada a cabo para lanzar al mercado nuevos medicamentos de este antifúngico cada vez más perfeccionados, se han realizado también diversos estudios para intentar aumentar su solubilidad en medio acuoso así como también mejorar su estabilidad. En los últimos años ha cobrado gran interés el uso de las ciclodextrinas para incrementar la solubilidad y estabilidad de la anfotericina B (EP147851B1, US4883785A, WO8910739A1). Se ha demostrado que las ciclodextrinas forman un complejo con anfotericina B que presenta una solubilidad en agua y una estabilidad que son sustancialmente mayores que las de los compuestos o formulaciones conocidas de anfotericina B. Además el complejo tiene una palatabilidad, estabilidad a la luz y toxicidad mejoradas respecto a las formulaciones o compuestos de anfotericina B conocidos. Entre las ciclodextrinas que se han usado a tal efecto destaca el uso de  $\gamma$ -ciclodextrina (EP147851B1) por los buenos resultados que se obtienen.

Se han descrito también diversas alternativas a la utilización de la  $\gamma$ -ciclodextrina que proporcionan, como ella, buenos resultados. Por ejemplo, en la patente WO8910739A1 se propone un derivado hidroxialquil ciclodextrina en lugar de la molécula base de  $\gamma$ -ciclodextrina. Asimismo, en la patente WO2006089007A2 se expone la utilización de un nuevo derivado polimerizado de ciclodextrina al que la anfotericina B se une por enlace covalente (unión pues de mayor grado de fuerza que la descrita en las patentes anteriores).

ES 2 387 440 A1

Adicionalmente, se han propuesto también alternativas respecto al método de síntesis de estos complejos anfotericina B-ciclodextrina (abreviadamente, AMB-CD). Desde que se propuso la utilización de las ciclodextrinas para aumentar la solubilidad y estabilidad de la anfotericina B se han estado usando diversas variantes de un mismo método de síntesis del complejo anfotericina B-ciclodextrina. Este método se basa en un cambio de pH y en el uso de disolventes, como el etanol, y posterior secado y eliminación de restos por liofilización o atomización. En contraposición, en la patente JP8059483A se describe un nuevo método para elaborar dichos complejos. Esta nueva alternativa de síntesis propone la utilización del disolvente dimetilsulfóxido (DMSO), disolvente más tóxico que los usados convencionalmente, que luego se retira por diálisis.

Las formulaciones de anfotericina B comercializadas hasta la fecha están destinadas a administrarse prioritariamente por vía intravenosa y la forma farmacéutica en la que se comercializan es la de polvo liofilizado. Para poder administrar la anfotericina B por vía intravenosa, se deberá dispersar previamente el liofilizado en medio acuoso. El periodo de validez (o estabilidad física y química en uso tras la dilución) del polvo de anfotericina B una vez dispersado en medio acuoso es muy corto (unos pocos días y conservado en nevera), lo que dificulta su uso comercial.

Además, en los últimos años se ha producido el agravamiento de varios problemas sanitarios que demandan el desarrollo de formulaciones tópicas de anfotericina B:

- Prevención de infecciones nosocomiales: En enfermos hospitalizados se acentúa el peligro de infección fúngica provocada por los catéteres y sondas. Por esta razón, y de forma preventiva, se usan combinaciones de antifúngicos de amplio espectro (especialmente anfotericina B) con antibióticos preparados generalmente en los servicios de Farmacia del propio hospital. En estos casos es muy importante que el producto a administrar sea además lubricante y tenga un cierto efecto adhesivo sobre la sonda para que su acción perdure en el tiempo existiendo siempre un contacto estrecho entre el fármaco y la sonda. La

ES 2 387 440 A1

forma farmacéutica idónea del medicamento a administrar para esta aplicación es la presentación en forma de gel.

- 5 - Tratamiento y prevención de infecciones fúngicas en inmunodeprimidos: Tanto en inmunodepresiones patológicas (SIDA) como iatrogénicas (por antiinflamatorios corticoides, trasplantes, etc.) pueden aparecer infecciones en mucosas (boca, vagina, ojos,...) debidas a la microbiota oportunista, especialmente del género *Candida*. Para esta aplicación resultan muy interesantes los geles (si son muy diluidos podrían ser colirios) y las cremas. El uso de estas formulaciones tópicas se hace especialmente idóneo en el caso de  
10 infecciones en la cavidad bucal para las que deben usarse compuestos especialmente adhesivos y resistentes al agua para que tengan efectos prolongados.
- 15 - Tratamiento de micosis cutáneas: Las micosis cutáneas se suelen asociar a un deficiente secado y contaminación (agravándose en pacientes inmunodeficientes) en pies y espalda. Un exceso de humedad puede favorecer la aparición de estas infecciones que se suelen tratar secando la zona (talco) y aplicando cremas, pomadas o geles antifúngicos.

En la presente invención se describen formulaciones de anfotericina B para  
20 administración por vía tópica en las que tanto el uso en calidad de excipiente de la  $\gamma$ -ciclodextrina, que proporciona un aumento en la solubilidad en medio acuoso de la anfotericina B, como la nueva forma de presentación del medicamento a administrar (gel, crema, pomada o colirio), que facilita el contacto de la misma con el agente infectante, proporcionan como resultado final un aumento en el efecto farmacológico  
25 de la anfotericina B. Gracias a este aumento en su efecto farmacológico la anfotericina manifiesta acción antiparasitaria (en concreto, antileishmaniosis) además de la acción antimicótica (cutánea, mucocutánea y superficial) principal indicación para la que se prescribe actualmente la anfotericina B. Además, las formulaciones preparadas en la presente invención presentan un perfil de seguridad drásticamente mejorado con  
30 respecto al de cualquiera de las formulaciones de anfotericina B conocidas hasta ahora.

ES 2 387 440 A1

### Explicación de la Invención

En primer lugar, se debe tener en cuenta que el uso en esta descripción y en las reivindicaciones de los artículos el/la, un/a/o incluye la referencia al plural a no ser  
5 que en el contexto se indique explícitamente lo contrario.

La invención se refiere a nuevas formulaciones farmacéuticas de anfotericina B de administración por vía tópica, así como a su método de preparación y a sus aplicaciones. En dichas formulaciones la anfotericina B se encuentra formando un  
10 complejo con ciclodextrina. En concreto, en las formulaciones farmacéuticas de la presente invención la anfotericina B se encuentra formando un complejo con  $\gamma$ -ciclodextrina.

La formación del complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina aumenta la solubilidad en  
15 medio acuoso de la anfotericina B y esto provoca, a su vez, una disminución de la afinidad de la misma por los componentes grasos de las formulaciones farmacéuticas. De esta forma, el complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina se liberará de su vehículo con más facilidad y en mayor medida que la anfotericina B sin complejar.

A su vez, la  $\gamma$ -ciclodextrina actúa también como promotora de absorción y ejerce una acción adhesiva por lo que favorecerá la penetración y la actividad de la anfotericina B.  
20

Asimismo, la forma de presentación de las formulaciones farmacéuticas de la presente  
25 invención, en concreto, gel, crema, pomada y colirio, facilita el contacto del antifúngico con el agente infectante.

La acción combinada de todas las características descritas contribuye al aumento del efecto farmacológico de la anfotericina B gracias al cual ésta manifiesta actividad  
30 antiparasitaria (en concreto, antileishmaniosis) además de la acción antimicótica (cutánea, mucocutánea y superficial), principal indicación para la que se prescribe actualmente la anfotericina B.



ES 2 387 440 A1

Otro aspecto importante de las formulaciones farmacéuticas de la presente invención es que la anfotericina B presenta un estado de agregación monomérico, a diferencia del estado de agregación que suele presentar ésta en las formulaciones farmacéuticas comercializadas hasta el momento, que es el estado dimérico.

Además, las formulaciones farmacéuticas descritas en la presente invención presentan una estabilidad física y química superior que las formulaciones de anfotericina B comercializadas hasta el momento. Esta estabilidad física y química superior se explica, en parte, por el estado de agregación monomérico que presenta la anfotericina B en las formulaciones de la invención, así como por el hecho de encontrarse formando un complejo con la  $\gamma$ -ciclodextrina.

Tal y como ya se ha comentado, la interacción entre los dos componentes del complejo, anfotericina B y  $\gamma$ -ciclodextrina, tiene como resultado un efecto solubilizante de la anfotericina B en medios acuosos. Dicho efecto se fundamenta en la formación de micelas en una relación molar de anfotericina B: $\gamma$ -ciclodextrina entre 1:50 y 1:200. Dicho de otra forma, cada molécula de anfotericina B está influenciada por la presencia de entre 50 y 200 moléculas de  $\gamma$ -ciclodextrina a su alrededor.

La presente invención se refiere, en primer lugar, a nuevas formulaciones tópicas de anfotericina B en distintas formas farmacéuticas: gel, crema, pomada y colirio. Estas formulaciones de la invención comprenden un complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina y un excipiente tópico farmacéuticamente aceptable, y se caracterizan además porque la relación molar entre la anfotericina B y la  $\gamma$ -ciclodextrina está dentro del intervalo entre 1:50 y 1:200 y porque la anfotericina B presenta un estado de agregación monomérico.

En la presente invención, la expresión "un excipiente tópico" se refiere a cualquier componente, o componentes, distinto del principio activo, en este caso anfotericina B, presente en la formulación farmacéutica o utilizado en su fabricación y cuya función

ES 2 387 440 A1

es servir como soporte (vehículo o base) del principio activo y facilitar su fabricación y administración por vía tópica.

En la formulación farmacéutica en gel de la invención, el excipiente tópico a usar es un excipiente adecuado para la preparación de geles. Dicho excipiente adecuado para la preparación de geles se selecciona entre derivados de celulosa, derivados de guar, polímeros vinílicos, polímeros carboxivinílicos, polímeros acrílicos, polímeros naturales, y/o combinaciones de los mismos. De forma preferida, el excipiente adecuado para la preparación de geles se selecciona entre metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y copolímeros reticulados de acrilato de alquilo C<sub>10-30</sub>.

En la presente invención, la expresión "excipiente adecuado para la preparación de geles" se refiere a cualquier excipiente tópico farmacéuticamente aceptable indicado para la fabricación de formulaciones farmacéuticas en forma de gel.

En la formulación farmacéutica en crema de la invención, el excipiente tópico a usar es un excipiente adecuado para la preparación de cremas. Dicho excipiente adecuado para la preparación de cremas se selecciona entre siliconas, derivados de siliconas, bases emulgentes aceite/agua (abreviadamente, O/A) de tipo no iónico, y/o combinaciones de los mismos. De forma preferida, el excipiente adecuado para la preparación de cremas se selecciona entre ciclometicona y dimeticona.

En la presente invención, la expresión "excipiente adecuado para la preparación de cremas" se refiere a cualquier excipiente tópico farmacéuticamente aceptable indicado para la fabricación de formulaciones farmacéuticas en forma de crema.

En la formulación farmacéutica en pomada de la invención, el excipiente tópico a usar es un excipiente adecuado para la preparación de pomadas. Dicho excipiente adecuado para la preparación de pomadas se selecciona entre un excipiente adhesivo oral, parafina, derivados de parafina, bases agua/aceite (abreviadamente, A/O), cremas agua/aceite (abreviadamente, A/O), y/o combinaciones de los mismos. De forma preferida, el excipiente adecuado para la preparación de pomadas es una mezcla

ES 2 387 440 A1

comprendida por carboximetilcelulosa sódica, pectina y gelatina, en una base de polietileno y aceite mineral.

- 5 En la presente invención, la expresión “excipiente adecuado para la preparación de pomadas” se refiere a cualquier excipiente tópico farmacéuticamente aceptable indicado para la fabricación de formulaciones farmacéuticas en forma de pomada.

La formulación farmacéutica en colirio de la invención comprende el complejo de  
10 anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina disuelto en suero salino o glucosado.

En la presente invención se reivindica también el uso de las formulaciones farmacéuticas descritas para el tratamiento de infecciones fúngicas y/o parasitarias en seres humanos y/o animales. De forma más concreta, las formulaciones farmacéuticas  
15 de la invención se pueden usar para el tratamiento de micosis superficiales, cutáneas y mucocutáneas, así como para el tratamiento de leishmaniosis cutánea.

La presente invención se refiere también al método para la preparación de las formulaciones farmacéuticas descritas anteriormente. Este método comprende, en  
20 primer lugar, la solubilización de la anfotericina B mediante formación de un complejo con  $\gamma$ -ciclodextrina y, en segundo lugar, la preparación de cada una de las formulaciones farmacéuticas de la invención (gel, crema, pomada y colirio) mediante la adición de un excipiente tópico farmacéuticamente aceptable a la solución del complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina. En concreto, el método para la preparación  
25 de las formulaciones de la presente invención comprende las siguientes etapas:

- a) se prepara una disolución en medio acuoso de  $\gamma$ -ciclodextrina y se ajusta el pH de dicha disolución hasta un valor entre 11,5 y 14,  
b) a continuación se añade la anfotericina B a la disolución de la etapa (a) en una  
30 relación molar anfotericina B: $\gamma$ -ciclodextrina entre 1:50 y 1:200 y se agita constantemente hasta su completa disolución,  
c) se ajusta el pH de la mezcla de la etapa (b) a un valor entre 4 y 8.

ES 2 387 440 A1

- d) se añade un excipiente tópico farmacéuticamente aceptable a la solución del complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina de la etapa (c).

Para la preparación de la formulación farmacéutica en gel de la invención se ha de añadir como excipiente tópico en la etapa (d) del método, un excipiente adecuado para la preparación de geles y, además, se han de añadir las siguientes etapas a continuación de la etapa (d):

Etapa (e): se agita suavemente.

Etapa (f): se deja en reposo durante un tiempo comprendido entre un minuto y tres días.

En concreto, el excipiente adecuado para la preparación de geles se selecciona entre derivados de celulosa, derivados de guar, polímeros vinílicos, polímeros carboxivinílicos, polímeros acrílicos, polímeros naturales, y/o combinaciones de los mismos. De forma preferida, el excipiente adecuado para la preparación de geles se selecciona entre metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y copolímeros reticulados de acrilato de alquilo C<sub>10-30</sub>, tales como Carbopol® Ultrez 20 y Carbopol® ETD 2020.

Para la preparación de la formulación farmacéutica en crema de la invención se ha de añadir como excipiente tópico en la etapa (d) del método, un excipiente adecuado para la preparación de cremas, y además, se ha de añadir la siguiente etapa a continuación de la etapa (d):

Etapa (e): se agita durante un tiempo comprendido entre un minuto y una hora.

En concreto, el excipiente adecuado para la preparación de cremas se selecciona entre siliconas, derivados de siliconas, bases emulgentes O/A de tipo no iónico, y/o combinaciones de los mismos. De forma preferida, el excipiente adecuado para la preparación de cremas se selecciona entre ciclometicona y dimeticona.

Para la preparación de la formulación farmacéutica en pomada de la invención se ha de añadir como excipiente tópico en la etapa (d) del método, un excipiente adecuado

ES 2 387 440 A1

para la preparación de pomadas, y además, se han de añadir las siguientes etapas a continuación de la etapa (c) y antes de la etapa (d):

Etapla (c1): se liofiliza el complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina de la etapa (c),

Etapla (c2): se pulveriza el liofilizado de la etapa (c1).

5

En concreto, el excipiente adecuado para la preparación de pomadas se selecciona entre un excipiente adhesivo oral, parafina, derivados de parafina, bases A/O, cremas A/O, y/o combinaciones de los mismos. De forma preferida, el excipiente adecuado para la preparación de pomadas es Orabase<sup>®</sup> (mezcla comprendida por carboximetilcelulosa sódica, pectina y gelatina, en una base de polietileno y aceite mineral).

10

Para la preparación de la formulación farmacéutica en colirio de la invención se han de reemplazar las anteriores etapas (a) y (c) por las siguientes nuevas etapas (a') y (c'), respectivamente, añadiéndose además una nueva etapa (c'1) a continuación de la nueva etapa (c'), y omitiéndose la etapa (d):

15

Etapla (a'): se prepara una disolución de  $\gamma$ -ciclodextrina en medio salino isotónico o en suero glucosado y se ajusta el pH de dicha disolución hasta un valor entre 11,5 y 14,0,

Etapla (c'): se ajusta el pH de la mezcla de la etapa (b) a un valor entre 7,2 y 7,6.

20

Etapla (c'1): se lleva a cabo una filtración esterilizante.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención han demostrado tener una mayor actividad frente a micosis superficiales, cutáneas y mucocutáneas (se probaron 11 cepas de levadura diferentes) que la formulación convencional de la anfotericina B (anfotericina B desoxicolato) y que la formulación de anfotericina B disuelta en DMSO.

25

Adicionalmente, estas formulaciones han demostrado en distintos estudios *in vivo* ser eficaces para su uso contra Leishmania (se probaron 6 especies de *Leishmania* diferentes) mostrando, además, un perfil de seguridad mucho mayor que la formulación convencional de anfotericina (anfotericina B desoxicolato) y que la

30

ES 2 387 440 A1

formulación de anfotericina B disuelta en DMSO, al presentar mucha menos citotoxicidad que dichas formulaciones.

Asimismo, las formulaciones descritas en la presente invención han mostrado una  
5 estabilidad física y química marcadamente superior frente a la de la formulación convencional de anfotericina (anfotericina B desoxicolato).

A continuación se ilustra la invención mediante los siguientes ejemplos de  
preparación de las nuevas formulaciones farmacéuticas de anfotericina B así como  
10 diferentes estudios realizados con el fin de evaluar los resultados concretos de eficacia y toxicidad obtenidos con estas formulaciones. Estos ejemplos son simplemente ilustrativos pero no limitativos del alcance de la invención.

#### Modo de realización preferido

15

#### **Ejemplo 1. Formación y caracterización de complejos de anfotericina B con $\gamma$ -ciclodextrina**

Para preparar el complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina primero se disolvió  $\gamma$ -  
20 ciclodextrina en agua. A continuación, se añadió hidróxido sódico 2N para aumentar el pH a 12 y posteriormente se adicionó la anfotericina B con agitación hasta su disolución completa. Una vez disuelta la anfotericina B, se procedió a neutralizar la disolución con ácido fosfórico llevando el pH a 5,5 (valor de pH para la piel). Para  
25 determinar las características de la interacción anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina se ensayaron distintas cantidades de ambos componentes y, tras filtrar por una membrana de 0,45  $\mu$ m, las muestras se analizaron por espectrofotometría a 364 nm. De esta forma, se realizó un diagrama de solubilidad anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina a 25°C para lo cual se preparó previamente una disolución de anfotericina B en  
30 dimetilsulfóxido con el fin de obtener una recta de calibrado que permitiera la cuantificación de la solubilidad de anfotericina B en presencia de  $\gamma$ -ciclodextrina por comparación con los datos de solubilidad de la anfotericina B en la recta de calibrado. A partir del diagrama de solubilidad hallado se determinó que la relación molar entre

ES 2 387 440 A1

la anfotericina B y la  $\gamma$ -ciclodextrina en el complejo formado y para las condiciones concretas en las que se realizaron los ensayos de solubilidad era de 1:70 (anfotericina B: $\gamma$ -ciclodextrina) (dicho diagrama de solubilidad se muestra en la figura 1). Al mismo tiempo, la técnica espectrofotométrica permitió también la determinación del estado de agregación (monomérico, dimérico o poliagregado) de la anfotericina B en el complejo formado, ya que se había observado previamente que los picos de máxima absorbancia del espectro de IR de anfotericina B variaban según el estado de agregación de la misma.

- 10 Mediante un barrido espectrofotométrico de la disolución de anfotericina B en  $\gamma$ -ciclodextrina (AMB- $\gamma$ -CD) (tanto en medio salino como en medio glucosado) se comprobó que la disposición de la anfotericina B correspondía al estado de agregación monomérico (Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP y Torrado-Santiago S. Amphotericin B formulations and drug targeting. J. Pharm. Sci. 2008; 97, 2405-2425).
- 15 Asimismo, se analizó el tamaño de las partículas mediante dispersión láser (Zetatrak Ultra, Microtrac Inc.). El tamaño hidrodinámico del complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina resultó ser inferior a 1 nm. Es importante resaltar que con el paso del tiempo (a partir de una semana, en el caso de la disolución de anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina en medio salino; y a partir de dos semanas, en el caso de la disolución
- 20 de anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina en medio glucosado) se apreció en el complejo una tendencia a la agregación evidenciada por el aumento del tamaño de partícula (característica que revela la inestabilidad física).

- 25 Para finalizar la caracterización, se liofilizó una disolución acuosa del complejo anfotericina B: $\gamma$ -ciclodextrina en una relación molar 1:70, y el sólido obtenido se analizó por difracción de rayos X, espectrofotometría infrarroja (IR) y calorimetría diferencial de barrido. Los resultados obtenidos tanto mediante difracción de rayos X como mediante calorimetría diferencial de barrido evidenciaban la existencia de un sólido amorfo que difería de la estructura molecular del material de partida,
- 30 anfotericina B, que es un sólido cristalino.

ES 2 387 440 A1

Se realizó asimismo un estudio comparativo de las distintas formulaciones preparadas, usando como técnica la espectrofotometría infrarroja. La figura 2 muestra el resultado del estudio. Comparando el espectro de IR del liofilizado (complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina) frente al de anfotericina B (mostrados ambos en la Fig. 2), se observó

5 que la región del espectro correspondiente tanto al grupo  $\text{-NH}_2$  como al resto  $\text{-OH}$  del grupo ácido carboxílico (entre  $1000\text{ cm}^{-1}$  y  $1500\text{ cm}^{-1}$ ) había quedado oculta, lo que sugería que esos grupos de la molécula de anfotericina B podrían haberse modificado durante la formación del complejo. También podía apreciarse un estiramiento de los picos ubicados en la región alrededor de los  $1800\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a los grupos  $\text{-CH}_3$  y al resto  $\text{-CO}$  del grupo ácido carboxílico de la molécula de anfotericina B, y en

10 la región alrededor de  $1400\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a los grupos  $\text{-OH}$  (grupos alcohol) de la misma, lo que indica la formación de enlaces de hidrógeno. Por lo tanto, los espectros de IR evidenciaron la interacción existente entre la anfotericina B y la ciclodextrina. Dicha interacción tiene como resultado un efecto solubilizante de la anfotericina por formación de micelas en una relación molar de anfotericina B: $\gamma$ -ciclodextrina de 1:70 tal y como se dedujo anteriormente a partir del diagrama de solubilidad de anfotericina B en presencia de  $\gamma$ -ciclodextrina. Todas las alteraciones

15 observadas en las señales del espectro de IR correspondientes a la fracción de anfotericina y producidas por la formación del complejo anfotericina-ciclodextrina se explican por la influencia de las 70 moléculas de  $\gamma$ -ciclodextrina sobre cada molécula de anfotericina. En vista de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la conveniencia de añadir un exceso de ciclodextrina para mejorar la estabilidad física del complejo evitando así problemas de agregación, hecho que había sido comprobado experimentalmente con anterioridad por los propios inventores, se estableció como

20 preferida una relación molar (anfotericina B: $\gamma$ -ciclodextrina) de 1:100. Es importante señalar que, en la práctica, el límite de solubilidad real de la anfotericina B en medio acuoso y a  $25^\circ\text{C}$ , es de  $2,8\text{ g/l}$  (gramos de anfotericina B por cada litro de la solución formada por anfotericina B y agua).

30 **Ejemplo 2. Preparación de distintas formulaciones farmacéuticas tópicas de anfotericina B y selección de las formulaciones preferidas de la invención**



ES 2 387 440 A1

## 2.A. Preparación de distintas formulaciones farmacéuticas tópicas de anfotericina B

2.A.1. Preparación de formulaciones farmacéuticas de anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina  
5 en forma de gel:

En primer lugar, se preparó el complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina. Para ello se  
disolvieron 12,5 gramos de  $\gamma$ -ciclodextrina en aproximadamente 50 ml de agua  
desionizada. La solución obtenida se llevó a pH 12,0 mediante la adición de hidróxido  
10 de sodio 2N, se adicionaron 125 mg de anfotericina B con agitación constante hasta su  
total disolución y se llevó la solución obtenida a pH 5,5 utilizando ácido fosfórico 2N,  
para finalmente completar el volumen a 100 ml con agua desionizada.

En segundo lugar, se prepararon distintas formulaciones en gel utilizando los  
15 siguientes agentes gelificantes:

- Hidroxipropilcelulosa Tipo H (Hypromelosa)
- Carbopol® ETD 2020
- Carbopol® Ultrez 20
- 20 - Metilcelulosa (Metolosa 1500)

- Respecto a los geles derivados de celulosa: Se prepararon geles con  
hidroxipropilcelulosa al 3% en peso (p/p) y con metilcelulosa al 2% p/p. Para ello, se  
adicionó el agente gelificante a la solución del complejo anfotericina B con  $\gamma$ -  
25 ciclodextrina, agitando de forma suave para no generar burbujas, y la mezcla se dejó  
en reposo durante 24 horas para su completa homogenización.

- Respecto a los geles con Carbopol® (derivados acrílicos): Se prepararon geles  
utilizando dos agentes gelificantes distintos, Carbopol® ETD 2020 y Carbopol® Ultrez  
30 20. Para ello, se añadió en cada caso el agente gelificante a una concentración del 1%  
p/p, se dispersó en la solución del complejo anfotericina B con  $\gamma$ -ciclodextrina, y se  
ajustó el pH a un valor de 5,5 con trietanolamina.

ES 2 387 440 A1

2.A.2. Preparación de formulaciones farmacéuticas de anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina en forma de crema:

- 5 Se ensayó una formulación en crema utilizando una mezcla de siliconas, concretamente Dow Corning 3225C (15% p/p) y ciclometicona (15% p/p). Se prepararon 100 gramos de formulación en crema de la siguiente manera:

En primer lugar se preparó el complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina. Para ello, en un  
 10 vaso de precipitados, se disolvió la  $\gamma$ -ciclodextrina en aproximadamente 40 ml de agua y se añadieron gotas de una solución de hidróxido de sodio 2 N hasta ajustar el valor del pH de la disolución a 12,0. Manteniendo la agitación constante, se agregó la anfotericina B y se continuó con la agitación hasta total disolución. Se añadieron unas gotas de una solución de ácido fosfórico 2N hasta llevar a pH 5,5. Esta solución se  
 15 completó con agua hasta un volumen de 70 ml, disolviendo previamente en ella 1 gramo de cloruro sódico.

En segundo lugar, se preparó la formulación farmacéutica en crema. Para ello, en otro vaso de precipitados se mezclaron 15 ml de ciclometicona y 15 ml de Dow Corning  
 20 3225C y se agitaron utilizando un homogenizador Ultra Turrax. A esta mezcla se adicionó poco a poco y manteniendo la agitación, la solución preparada en primer lugar que contenía el complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina, y se continuó con la agitación, hasta conseguir la consistencia deseada.

- 25 2.A.3. Preparación de formulaciones farmacéuticas de anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina en forma de pomada:

Se preparó una formulación en forma de pomada empleando el excipiente adhesivo oral Orabase®. Esta base adhesiva está constituida por carboximetilcelulosa sódica,  
 30 pectina, gelatina y una mezcla de parafina líquida y polietileno. Se escogió este excipiente en concreto para la preparación de la pomada de la invención debido a sus propiedades adherentes y a su efecto protector en lesiones de la piel.

ES 2 387 440 A1

En primer lugar, se preparó el complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina siguiendo el procedimiento de preparación del mismo detallado en el apartado 1 de este ejemplo.

- 5 En segundo lugar, se liofilizó el complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina resultante a fin de eliminar el agua de dicho complejo. El liofilizado resultante, previamente pulverizado en un mortero, se mezcló con la base adhesiva hasta su completa homogenización sin grumos.

- 10 2.A.4. Preparación de formulaciones farmacéuticas de anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina en forma de colirio:

Se elaboró una formulación de anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina en forma de colirio. Para ello se preparó en primer lugar, al igual que para todas las formulaciones de la invención, el complejo anfotericina B con  $\gamma$ -ciclodextrina. Sin embargo, para esta formulación farmacéutica en particular, la preparación del complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina presenta varias diferencias respecto al resto de formulaciones de la invención. Se disolvieron 14,375 gramos de  $\gamma$ -ciclodextrina en aproximadamente 50 ml de, o bien una solución salina fisiológica estéril, o bien una solución estéril de dextrosa al 5% p/v. La solución obtenida se llevó a pH 12,0 con hidróxido de sodio 2N, se adicionaron 143,75 mg de anfotericina B con agitación constante hasta su total disolución y se llevó la solución obtenida a pH 7,4 utilizando ácido ortofosfórico 2N para finalmente completar el volumen hasta 100 ml con, o bien la solución salina fisiológica estéril, o bien la solución estéril de dextrosa al 5% p/v, según la solución que se usara al principio. Posteriormente, se realizó una filtración esterilizante con un filtro de 0,22  $\mu$ m de acetato de celulosa Minisart NML<sup>®</sup> Sartorius. A la hora de calcular la cantidad de cada uno de los reactivos de partida (anfotericina B y  $\gamma$ -ciclodextrina) necesaria para la preparación de la formulación en colirio de la invención, se tuvo en cuenta que un 15% de la formulación final queda retenido en el filtro.

15  
20  
25  
30

ES 2 387 440 A1

**2.B. Caracterización de las distintas formulaciones preparadas, comparación de las mismas en términos de actividad antifúngica y selección de las formulaciones preferidas de la invención**

- 5 Se determinó la viscosidad de cada una de las formulaciones anteriores así como el estado de agregación de anfotericina B en cada formulación, y se evaluó el efecto *in vitro* de las distintas formulaciones sobre *Candida albicans* mediante antifungigrama por difusión.
- 10 La viscosidad varió según la formulación entre 50 y 4000 cps (Brookfield DV-III, aguja CP41, entre 5 y 25 rpm y  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ). El estado de agregación se mantuvo como monomérico en todas las formulaciones menos en la formulación en gel con hidroxipropilcelulosa que varió a poliagregado. Por otra parte, en el análisis por espectrofotometría de las formulaciones en gel con Carbopol® se apreció un descenso
- 15 en absorbancias con respecto a la formulación en gel con metilcelulosa lo que puede ser indicativo de una deficiente liberación de la anfotericina B.

- Para el estudio de sensibilidad se utilizó como medio de cultivo agar Mueller Hinton (MHA) suplementado con 2 % p/v de glucosa y 0,5 µg/ml de azul de metileno. Se
- 20 prepararon soluciones de anfotericina B en dimetilsulfóxido a las concentraciones de 600; 240; 96; 38,4 y 15,4 µg/ml. Las muestras del gel, crema y colirio de anfotericina B se disolvieron/dispersaron inicialmente en agua y luego en tampón fosfato 0,2 M pH 10,5 a una concentración de 96 µg/ml. Los discos de papel para ensayo se impregnaron con 20 µl de cada solución estándar y de muestra, se dejaron secar
  - 25 durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguidamente fueron colocados en las placas de cultivo que contenían MHA y se inocularon con la suspensión del hongo (*C. albicans* 1394). Tras ser mantenidas en refrigeración a 5°C durante 2 horas, las placas se incubaron a 30°C durante 48 horas, para medir posteriormente los halos de inhibición.

ES 2 387 440 A1

Formulación	Halo de inhibición en mm
AMB en DMSO	24,9 ± 0,1
AMB desoxicolato	22,5 ± 0,1
AMB-γ-CD (gel) con metilcelulosa	24,8 ± 0,2
AMB-γ-CD (gel) con hidroxipropilcelulosa	12,6 ± 0,3
AMB-γ-CD (gel) con Carbopol® ETD 2020	18,1 ± 0,1
AMB-γ-CD (gel) con Carbopol® Ultrez 20	18,7 ± 0,1
AMB-γ-CD (crema) con siliconas	26,4 ± 0,2
AMB-γ-CD (colirio)	27,0 ± 0,3

Tabla 1. Resultados de actividad de las distintas formulaciones estudiadas en relación con anfotericina B disuelta en DMSO (AMB en DMSO) y anfotericina B desoxicolato (AMB desoxicolato).

5

Se descartaron las formulaciones con hidroxipropilcelulosa y con Carbopol® al demostrar una actividad fungicida inferior. Consecuentemente, se seleccionó la formulación en gel con metilcelulosa como la formulación en gel preferida de la invención. También se estudió el posible efecto de la viscosidad del gel en la sensibilidad. Para ello se prepararon geles de metilcelulosa con concentraciones al 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 y 4,0 % p/p y con viscosidades crecientes desde 330 cps hasta 3500 cps. La actividad antimicrobiana de todas ellas fue similar, por lo que se eligió una concentración de metilcelulosa al 3% p/p como la más adecuada por su viscosidad (1520-2470 cps).

### Ejemplo 3. Estudio de la actividad antifúngica de las formulaciones de la invención

20

Siguiendo el método de preparación de la formulación farmacéutica en gel de la invención descrito en el ejemplo 2, se preparó la formulación farmacéutica en gel de anfotericina B-γ-ciclodextrina seleccionada como preferida en el ejemplo anterior.

ES 2 387 440 A1

Para ello, se usaron las siguientes cantidades de los distintos reactivos, excipientes y disolventes: anfotericina B (0,125 g),  $\gamma$ -ciclodextrina (12,5 g), metilcelulosa (3 g), pequeñas cantidades de NaOH, ácido ortofosfórico para ajustar el pH a un valor dentro del intervalo 5,5-5,7, y agua c.s.p. (cantidad suficiente para) 100. Se analizó la actividad antifúngica de esta formulación bajo diversas condiciones.

**3.1. Actividad frente a distintas cepas de hongos y comparación de resultados con un control comercial (Neosensitabs<sup>®</sup>, Rosco, Dinamarca)**

- 10 Para este estudio se utilizaron discos patrón de anfotericina B Neo-Sensitabs<sup>®</sup> que contenían 10  $\mu$ g de anfotericina B. Por otra parte, se prepararon soluciones control de anfotericina B disueltas en dimetilsulfóxido a las concentraciones de 600 y 96  $\mu$ g de anfotericina B por mililitro de solución, con el fin de que los discos cargados con 20  $\mu$ l de esta solución incorporaran 12 y 1,92  $\mu$ g de anfotericina B por disco. Asimismo,
- 15 para la formulación en gel de la invención se prepararon cuatro concentraciones en solución tampón fosfato (0,2 M pH 10,5) adecuadas para obtener discos con 0,96; 1,92; 5 y 10  $\mu$ g de anfotericina B por disco, respectivamente. El medio de cultivo empleado fue MHA suplementado con 2 % p/v de glucosa y 0,5  $\mu$ g/ml de azul de metileno. Este agar fundido a temperatura de 50°C fue inoculado con 3 ml de una
- 20 suspensión del hongo (se utilizaron varias cepas de levadura, véase Fig. 3), previamente ajustada a una absorbancia de 0,1 a 600 nm, en solución salina fisiológica (NaCl 0,9 % p/v). Dicha suspensión del hongo se había preparado a partir de cultivos de la levadura en agar Sabouraud dextrosa incubados durante 72 horas a 30°C.
- 25 Se impregnaron discos para ensayo con 20  $\mu$ l de cada una de las soluciones de control y de cada una de las soluciones de la formulación en gel de la invención, se dejaron secar durante 15 minutos a temperatura ambiente y finalmente se depositaron sobre las placas de MHA que contenían la suspensión del hongo. En estas mismas placas de cultivo se colocaron también discos patrón de anfotericina B Neo-Sensitabs<sup>®</sup>. Estas
- 30 placas se refrigeraron a 5°C durante 2 h y luego se incubaron a 30°C durante 48 h. Los resultados obtenidos al medir los halos de inhibición se muestran en la figura 3.

ES 2 387 440 A1

Los resultados de este ensayo comparativo, muestran que 10 µg de anfotericina B de la formulación en gel de la invención provocan una inhibición mayor que la producida por la misma cantidad del antifúngico en los discos patrón de anfotericina B Neo-Sensitabs®. Este resultado resulta sorprendente ya el DMSO se considera promotor de la absorción al igual que la ciclodextrina y, por otra parte, la anfotericina B disuelta en DMSO se presenta en forma monomérica exactamente igual que como ocurre en el caso de la formulación de anfotericina en gel de la invención. Caben varias posibles explicaciones a estos resultados, entre ellas, la posibilidad de que el gel retenga en las proximidades mayores concentraciones de anfotericina B siendo así el efecto dilución menor que con el DMSO, y/o una mayor estabilidad física y/o química de la anfotericina en la formulación en gel colocada en el disco en comparación con la formulación disuelta en DMSO, y/o una mejor difusión de la anfotericina B a través del agar.

### 3.2. Ensayo de sensibilidad

Este ensayo se realizó en las mismas condiciones que el experimento descrito en el apartado 2.B. para caracterizar todas las formulaciones de anfotericina B preparadas anteriormente en el apartado 2.A.. En la tabla 2 se muestra el promedio de las medidas de los halos de inhibición (en mm) obtenidos con cada una de las soluciones control de anfotericina B disuelta en dimetilsulfóxido preparadas (solución estándar 1 (S1) (600 µg/ml), solución estándar 2 (S2) (240 µg/ml), solución estándar 3 (S3) (96 µg/ml), solución estándar 4 (S4) (38,4 µg/ml) y solución estándar 5 (S5) (15,4 µg/ml)) y con la solución de la formulación en gel de la invención (solución de muestra (M) (96 µg/ml)) para cada cepa estudiada junto con su desviación estándar correspondiente. No se obtuvo halo de inhibición, para ninguna de las cepas estudiadas, ni al usar discos impregnados con el placebo de la formulación (formulación en gel sin anfotericina B), ni con discos únicamente tratados con el medio tamponado o con DMSO. En la presente invención se entiende por placebo de la formulación, aquella formulación que no contiene el principio activo (en este caso, anfotericina B) pero cuya preparación y composición es igual a la de la formulación de la invención).

ES 2 387 440 A1

Aplicando un análisis de datos mediante la prueba t-Student a los resultados obtenidos tanto con la formulación de anfotericina B disuelta en dimetilsulfóxido como con la formulación en gel de la invención, se determinó que los datos para la formulación en gel de la invención eran estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) a los datos de la anfotericina B disuelta en dimetilsulfóxido (las diferencias entre los valores de ambos eran estadísticamente significativas), ya que en todas las cepas estudiadas el valor t obtenido fue menor que el valor t tabulado, con lo que se anula la hipótesis de que las medias de los dos grupos de muestras son iguales.

CEPA	Anfotericina B disuelta en dimetilsulfóxido ( $\mu\text{g/ml}$ )					Formulación en gel de la invención ( $\mu\text{g/ml}$ )
	S1 600	S2 240	S3 96	S4 38,4	S5 15,4	M 96
1. <i>C. albicans</i> CECT 1394	29,1 $\pm$ 0,1	27,3 $\pm$ 0,1	25,9 $\pm$ 0,2	24,5 $\pm$ 0,1	22,4 $\pm$ 0,3	29,4 $\pm$ 0,2
2. <i>C. dubliniensis</i> 63341	27,7 $\pm$ 0,2	26,3 $\pm$ 0,2	25,3 $\pm$ 0,2	23,6 $\pm$ 0,1	22,3 $\pm$ 0,2	27,1 $\pm$ 0,3
3. <i>C. glabrata</i> 60661	20,2 $\pm$ 0,5	17,8 $\pm$ 0,7	16,5 $\pm$ 0,2	15,3 $\pm$ 0,2	13,2 $\pm$ 0,1	17,5 $\pm$ 0,2
4. <i>C. glabrata</i> 60750	22,1 $\pm$ 0,2	19,7 $\pm$ 0,4	18,1 $\pm$ 0,2	15,8 $\pm$ 0,4	13,6 $\pm$ 0,2	20,6 $\pm$ 0,3
5. <i>C. guilliermondii</i> 62863	16,5 $\pm$ 0,5	15,2 $\pm$ 0,1	13,3 $\pm$ 0,4	11,4 $\pm$ 0,4	10,0 $\pm$ 0,3	16,3 $\pm$ 0,3
6. <i>C. krusei</i> 52009	12,2 $\pm$ 0,1	11,2 $\pm$ 0,1	9,5 $\pm$ 0,2	7,9 $\pm$ 0,2	-	10,4 $\pm$ 0,4
7. <i>C. krusei</i> 52011	12,4 $\pm$ 0,4	10,9 $\pm$ 0,6	9,6 $\pm$ 0,3	8,9 $\pm$ 0,1	-	10,9 $\pm$ 0,1
8. <i>C. krusei</i> 55574	16,5 $\pm$ 0,3	14,3 $\pm$ 0,2	12,4 $\pm$ 0,3	10,2 $\pm$ 0,1	8,9 $\pm$ 0,3	15,1 $\pm$ 0,2
9. <i>C. parapsilosis</i> 57744	18,3 $\pm$ 0,1	16,4 $\pm$ 0,2	14,3 $\pm$ 0,2	13,6 $\pm$ 0,1	12,0 $\pm$ 0,1	17,9 $\pm$ 0,1
10. <i>Saccharomyces</i> 61978	19,2 $\pm$ 0,1	17,3 $\pm$ 0,2	15,6 $\pm$ 0,2	13,8 $\pm$ 0,2	12,0 $\pm$ 0,1	19,1 $\pm$ 0,4
11. <i>Trichosporon</i> sp. 61978	20,4 $\pm$ 0,3	18,5 $\pm$ 0,1	17,3 $\pm$ 0,2	14,6 $\pm$ 0,1	12,2 $\pm$ 0,1	21,7 $\pm$ 0,2

Tabla 2. Medida en mm del diámetro de los halos de inhibición, con su correspondiente desviación estándar, obtenidos en el ensayo de sensibilidad de diferentes cepas frente a anfotericina B. Como criterio para determinar la sensibilidad se estima que halos superiores a 15 mm corresponden a cepas sensibles, menores de 10 mm a cepas resistentes, y entre 10 y 14 a cepas intermedias.



ES 2 387 440 A1

### 3.3. Ensayo de inhibición de crecimiento de levadura sobre membrana

Para realizar este ensayo se preparó un preinóculo en 50 ml de medio mínimo YNB (base nitrogenada de levadura) con galactosa 50 mM y se incubó a 37 °C durante toda la noche. El cultivo se centrifugó a 4500 rpm durante 5 minutos y luego se lavó dos veces con PBS (solución salina tamponada con fosfato). Las células fueron finalmente suspendidas en PBS hasta una absorbancia de 0,2 a 600 nm.

Se prepararon soluciones de la formulación en gel de la invención a las siguientes concentraciones: 25, 50, 75, 150, 300, 450 y 600 µg/ml. Con estas soluciones se impregnaron membranas estériles de celulosa (Millipore) de 0,22 µm de diámetro de poro (6 membranas para cada una de las 11 cepas) durante un tiempo aproximado de 10 segundos. Posteriormente estas membranas se lavaron. Un primer grupo de ellas (3 de esas 6 membranas, para cada cepa) se enjuagaron tres veces consecutivas con una solución de PBS, mientras que un segundo grupo (las otras 3 membranas restantes) se sumergieron durante 1 hora también en PBS. Todas las membranas se dejaron secar durante 20 minutos a 37°C antes de ser inoculadas.

Se prepararon placas con agar Sabouraud dextrosa con galactosa 500 mM y sobre cada una de ellas se colocó una de las membranas que estuvieron en contacto con la formulación en gel de la invención. Se depositaron 50 µl de la suspensión en PBS del microorganismo en estudio sobre cada una de las membranas y se extendió esta suspensión por toda la membrana. Se secaron las placas a 37°C durante 1 hora para secar el inóculo y posteriormente se invirtieron las placas y se incubaron durante 48 horas más, reubicando la membrana dentro de la placa cada 10 ó 12 horas.

Se realizó el ensayo por triplicado para cada concentración (se usaron tres membranas para cada condición de ensayo) y además se prepararon placas control con membranas sin anfotericina B.

En la tabla 3 pueden observarse al detalle los resultados por triplicado de este ensayo. Para cada cepa, la primera fila de resultados corresponde a las membranas lavadas tres

ES 2 387 440 A1

veces con PBS (fila A), y la segunda fila a las membranas que se dejaron sumergidas durante una hora después de aplicar la formulación (fila B).

En este ensayo, los resultados obtenidos difieren entre sí dependiendo de la metodología utilizada y de la cepa empleada. Así, se visualizó un mayor crecimiento de todas las cepas ensayadas cuando la membrana inoculada con la formulación se dejaba en remojo durante una hora en PBS que cuando la membrana se lavaba tres veces consecutivas con esta misma solución. En concreto, el crecimiento de la especie *Candida krusei* fue mayor que el de las otras, lo que pone de manifiesto la mayor resistencia de esta especie frente a anfotericina B.

CEPA		CONTROL	CONCENTRACIÓN DE ANFOTERICINA B (µg/ml)							
			25	50	75	150	300	450	600	
<i>C. albicans</i> 1394	A	+ + +	- ± -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	
	B		- ± ±	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	
<i>C. dublin.</i> 63341	A	+ + +	+ + +	+ + ±	- - ±	- - -	- - -	- - -	- - -	
	B		+ + +	+ + +	+ + +	+ + ±	- - -	- - -	- - -	
<i>C. glabr.</i> 60661	A	+ + +	+ + +	+ + ±	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	
	B		+ + +	+ + ±	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	
<i>C. glabr.</i> 60750	A	+ + +	+ + +	+ + ±	± ± ±	± - -	- - -	- - -	- - -	
	B		+ + +	+ + +	+ + +	- - ±	- - -	- - -	- - -	
<i>C. guillier.</i> 62863	A	+ + +	+ + +	+ + ±	- - ±	- - -	- - -	- - -	- - -	
	B		+ + +	+ + ±	+ + +	+ + ±	- - -	- - -	- - -	
<i>C. krusei</i> 52009	A	+ + +	+ + +	+ + +	+ + ±	- - ±	- ± ±	- - ±	- - -	
	B		+ + +	+ + +	+ + +	+ + ±	- ± ±	- ± ±	- - ±	
<i>C. krusei</i> 52011	A	+ + +	+ + +	+ + +	+ + ±	± ± ±	- - -	- - -	- - -	
	B		+ + +	+ ± ±	+ ± ±	± ± ±	- - -	- - -	- - -	
<i>C. krusei</i> 55574	A	+ + +	+ + +	- - ±	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	
	B		+ + +	± ± ±	- ± ±	- - ±	- - ±	- - ±	- - -	
<i>C. paraps.</i> 57744	A	+ + +	+ + +	+ ± ±	- - ±	- - -	- - -	- - -	- - -	
	B		+ + +	+ + +	+ + ±	± ± ±	- - -	- - -	- - -	
<i>Sacchar.</i>		+ + +	+ + +	± ± ±	± ± ±	± ± ±	- - -	- - -	- - -	

ES 2 387 440 A1

61978	B		+++	+++	++±	±±±	- - -	- - -	- - -
Trichosp. 61978	A		+++	++±	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
	B	+++	+++	+++	++±	- - -	- - -	- - -	- - -

Tabla 3. Inhibición de la formación de biopelículas.

(+) : crecimiento en toda la membrana, (±) : crecimiento en parte de la membrana, (-) : membrana sin crecimiento. A: membranas lavadas tres veces con PBS; B: membranas que se dejaron sumergidas durante una hora después de aplicar la formulación.

### 3.4. Ensayo de penetración de anfotericina B en biopelículas fúngicas

Para realizar este ensayo se prepararon preinóculos de cada una de las cepas en estudio en 50 ml de medio mínimo YNB con galactosa 50 mM, siguiendo el mismo procedimiento usado para el ensayo de inhibición de crecimiento de levadura sobre membrana (punto anterior 3.3.), y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Los cultivos obtenidos se centrifugaron a 4500 rpm durante 5 minutos, posteriormente se lavaron dos veces con PBS y con las células obtenidas se preparó una suspensión en PBS y se ajustó hasta una absorbancia de 0,2 medida a 600 nm.

Para obtener las biopelículas se prepararon placas con agar Sabouraud dextrosa al que se adicionó galactosa 500 mM. Sobre cada una de las placas se colocó una membrana estéril de polipropileno de 0,22 µm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro que se inoculó con 50 µl de la suspensión en PBS. Las placas se secaron a 37°C durante 1 hora, y posteriormente se invirtieron e incubaron durante 48 horas más, reubicando la membrana dentro de la placa cada 10 ó 12 horas.

Para la incorporación de anfotericina B: Se preparó agar YNB con galactosa 500 mM, se esterilizó en autoclave y, antes de solidificar, se dividió en 6 porciones adicionándose a las mismas anfotericina B, en dos formas distintas, por un lado, la formulación de anfotericina B disuelta en dimetilsulfóxido y, por otro, la formulación en gel de la invención, para obtener placas, por duplicado (es decir, para cada una de las dos formulaciones), con las siguientes concentraciones en ambos casos: 150, 300 y 600 µg/ml. Las placas de agar YNB con galactosa a las que se les ha incorporado anfotericina B constituyen la capa A de la biopelícula de ensayo (véase la Fig. 4).

ES 2 387 440 A1

Sobre las placas de agar YNB con galactosa y anfotericina B se colocaron las membranas con o sin la biopelícula del microorganismo objeto de evaluación. Como controles se utilizaron los duplicados de cada placa en los que se habían dispuesto membranas estériles utilizando para ello membranas de exactamente las mismas  
5 características, 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y 47 mm de diámetro, pero en esta ocasión sin biopelícula. Estas membranas constituyen la capa B de la biopelícula de ensayo (véase la Fig. 4).

Sobre esta membrana, se dispone una nueva membrana que sirve de separación por  
10 contacto directo. En esta ocasión, se trata de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y 25 mm de diámetro. Esta nueva membrana constituye la capa C de la biopelícula de ensayo (véase la Fig. 4).

Sobre esta última membrana se colocaron discos para ensayo de 6 mm de diámetro  
15 impregnados con 20  $\mu\text{l}$  de PBS. Estos discos constituyen la capa D de la biopelícula de ensayo (véase la Fig. 4). Este sistema se incubó a 37°C durante 4 horas (Fig. 4). A lo largo del experimento estos discos, inicialmente sólo impregnados con PBS, fueron absorbiendo (en los casos donde procedía) anfotericina B conforme ésta se difundía, consiguiendo así progresivamente actividad antifúngica gracias precisamente a esa  
20 absorción de anfotericina B.

Para determinar el grado de penetración de anfotericina B a través de la biopelícula  
fúngica, los discos descritos anteriormente como capa D, fueron depositados sobre  
placas de agar Mueller Hinton inoculado con una suspensión de *Candida albicans*  
25 como microorganismo de referencia, de igual manera que para la determinación microbiológica de la sensibilidad frente a anfotericina B (apartado 3.2.). Se incubaron las placas a 30°C durante 48 horas y se midieron los halos de inhibición obtenidos (Samaranayake, Y. H., Ye, J., Yau, J. Y. Y., Cheung, B. P. K. and Samaranayake, L.P. In vitro method to study antifungal perfusion in Candida biofilms. Journal of  
30 Clinical Microbiology. Feb. 2005: 818-825; Al-Fattani, M. A. and Douglas, L. J. Penetration of Candida biofilm by antifungal agents. Antimicrobial agents and chemotherapy. Sep. 2004, Vol. 48, No. 9: 3291-3297). Los resultados se muestran en

ES 2 387 440 A1

la tabla 4. Observando las medidas de los halos de inhibición que se obtuvieron con el control, es decir, con la membrana sin biopelícula fúngica, se aprecian claramente las diferencias respecto a la cantidad de anfotericina B que pudo llegar hasta los discos colocados sobre la última membrana y que inicialmente sólo estaban impregnados con PBS. Al igual que en los ensayos anteriores, la formulación en gel de la invención se caracteriza por una gran capacidad de penetración.

CEPA		MEDIDAS DE HALOS DE INHIBICIÓN EN mm					
		AMB EN DIMETILSULFÓXIDO			FORMULACIÓN EN GEL DE LA INVENCION		
		150 ug/ml	300 ug/ml	600 ug/ml	150 ug/ml	300 ug/ml	600 ug/ml
1	<i>C. albicans 1394</i>	0	0	11,3 ± 0,56	29,9 ± 0,40	34,3 ± 0,20	38,6 ± 0,36
2	<i>C. dublin. 63341</i>	0	0	0	24,2 ± 0,66	29,2 ± 0,21	31,6 ± 0,40
3	<i>C. glabrata 60661</i>	0,0	2,0 ± 4,08	11,3 ± 0,71	23,9 ± 0,40	28,1 ± 1,40	31,6 ± 0,16
4	<i>C. glabrata 60750</i>	0	0	0	21,6 ± 0,18	28,3 ± 0,37	30,9 ± 0,16
5	<i>C. guillier. 62863</i>	9,5 ± 0,44	13,5 ± 0,16	17,4 ± 0,34	29,2 ± 0,09	31,7 ± 0,12	34,6 ± 0,22
6	<i>C. krusei 52009</i>	0	0	0	23,7 ± 0,22	28,4 ± 0,15	31,5 ± 0,42
7	<i>C. krusei 52011</i>	0	0	8,5 ± 0,30	26,4 ± 0,23	31,7 ± 0,20	35,3 ± 0,11
8	<i>C. krusei 55574</i>	0	0	7,5 ± 0,39	26,1 ± 0,10	30,5 ± 0,16	32,5 ± 0,08
9	<i>C. paraps. 57744</i>	0	0	10,7 ± 0,76	27,7 ± 0,44	29,4 ± 0,30	31,7 ± 0,09
10	<i>Sacchar. 61978</i>	0	0	2,1 ± 4,15	14,7 ± 0,25	30,4 ± 0,21	33,3 ± 0,24
11	<i>Trichosp. 61978</i>	0	2,3 ± 4,55	6,2 ± 7,20	24,4 ± 0,21	29,3 ± 0,20	33,2 ± 0,20
12	<i>Control</i>	12,5 ± 1,41	16,6 ± 1,77	18,8 ± 1,71	28,3 ± 1,84	31,6 ± 1,83	34,3 ± 1,55

Tabla 4. Penetración de anfotericina B en biopelículas fúngicas.

### 3.5. Determinación de la capacidad fungicida de anfotericina B en la biopelícula fúngica

Para realizar este ensayo se preparó un conjunto de tubos de ensayo estériles conteniendo 5 ml de PBS cada uno, tres tubos para el control y tres para cada concentración a evaluar (150, 300 y 600 µg/ml). De cada cepa se usaron las placas con

ES 2 387 440 A1

las membranas que se evaluaron en el ensayo de penetración de biopelículas (ensayo 3.4) y su correspondiente control. Utilizando el asa de siembra se tomó de cada membrana una fracción de colonias en un área de 2 mm<sup>2</sup> y se dispersaron en uno de los tubos con PBS utilizando un agitador vortex. De esta suspensión se prepararon diluciones para inocular placas de YED (Yeast-Extract Dextrose Medium, Extracto de levadura + dextrosa), y una vez inoculadas las placas se incubaron a 30°C durante 48 horas con el fin de determinar la proporción de células viables de la biopelícula tras el tratamiento con anfotericina B.

- Se obtuvieron diferentes resultados dependiendo de la cepa estudiada, de tal manera que las biopelículas de las siguientes cepas:
- *C. albicans* 1394
  - *C. glabrata* 60661
  - *C. parapsilosis* 57744
  - *Saccharomyces* 61978
  - *Trichosporon* 61978,

mostraron una mayor susceptibilidad frente a la formulación en gel de la invención que frente a la formulación de anfotericina disuelta en DMSO. El resto de las cepas, sin embargo, no mostraron diferencias significativas entre la viabilidad de las biopelículas expuestas a la formulación de anfotericina disuelta en DMSO con respecto a la formulación en gel de la invención.

En la tabla 5 puede visualizarse de forma detallada el número de colonias obtenidas para cada especie por mm<sup>2</sup> de biopelícula expuesta a la acción del antifúngico.

CEPA	UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)						
	AMB EN DIMETILSULFÓXIDO			FORMULACIÓN EN GEL DE LA INVENCION			CONTROL
	150 ug/ml	300 ug/ml	600 ug/ml	150 ug/ml	300 ug/ml	600 ug/ml	
1 <i>C. albicans</i> 1394	10000	8000	6500	180	4000	120	375000

ES 2 387 440 A1

2	<i>C. dublin. 63341</i>	15000	12500	80	12000	220	100	112500
3	<i>C. glabrata 60661</i>	6000	5000	3000	0	29	14	300000
4	<i>C. glabrata 60750</i>	5000	15000	18000	6000	8000	6500	250000
5	<i>C. guillier. 62863</i>	9000	750	1250	12500	600	320	15000
6	<i>C. krusei 52009</i>	45000	10000	6000	8000	7000	6000	175000
7	<i>C. krusei 52011</i>	200000	150000	35000	150000	8000	7000	200000
8	<i>C. krusei 55574</i>	9000	7500	6000	10000	7000	6000	175000
9	<i>C. paraps. 57744</i>	7500	5000	4000	6000	25000	150	2500
10	<i>Sacchar. 61978</i>	225000	10000	4300	10000	6000	120	20000
11	<i>Trichosp. 61978</i>	4000	400	10	400	50	120	200000

Tabla 5. Viabilidad de las biopelículas expuestas a un medio con anfotericina B. Se muestra el número de unidades formadoras de colonias por mm<sup>2</sup> de biopelícula obtenidas después de exponer la membrana con la biopelícula del microorganismo a anfotericina B disuelta en dimetilsulfóxido en comparación con la formulación en gel de la invención.

### 3.6. Comparación de eficacia contra la micosis cutánea entre la formulación en gel de la invención y clotrimazol en crema

Considerando que la formulación en crema de clotrimazol es actualmente el producto de primera elección en el tratamiento de micosis cutáneas, se realizó un ensayo de sensibilidad comparativo, utilizando *C. albicans* como microorganismo de referencia, entre clotrimazol en crema y la formulación en gel de la invención. Para ello se prepararon diluciones de anfotericina B en dimetilsulfóxido a las concentraciones de 600; 240; 96; 38,4 y 15,4 µg/ml, al igual que en los estudios anteriores, mientras que la formulación en gel de la invención, por su parte, se diluyó hasta una concentración de 60 µg/ml. Con la crema de clotrimazol se prepararon cuatro diluciones de clotrimazol en dimetilsulfóxido, de 96; 192; 480 y 960 µg/ml, considerando que la concentración teórica del antifúngico en la crema es del 1% p/p. Se inocularon discos para ensayo con las soluciones preparadas y se dispusieron sobre las placas de MHA que contenía la suspensión de *C. albicans*. Se incubaron las placas durante 48 horas a 30°C y se midieron los halos de inhibición.

Los resultados obtenidos muestran notables diferencias entre las dos formulaciones en estudio. Con la crema de clotrimazol, a diferencia de la formulación en gel de la

ES 2 387 440 A1

invención, únicamente se obtuvieron halos de inhibición claramente definidos con la concentración más alta (960 µg/ml). En la tabla 6 pueden observarse al detalle los resultados de este ensayo. A partir de los resultados obtenidos se observa que una concentración de 60 µg/ml de anfotericina B en la formulación en gel de la invención, da lugar a un halo de inhibición similar al que forma una concentración de 960 µg/ml de clotrimazol en la formulación de crema.

FORMULACIÓN	CONCENTRACION	HALO DE INHIBICIÓN (mm)
Anfotericina B en DMSO	15,4 µg /ml	24,3 ± 0,18
	38,4 µg /ml	27,5 ± 0,40
	96 µg /ml	28,6 ± 0,43
	240 µg /ml	30,6 ± 0,30
	600 µg/ml	32,3 ± 0,29
Formulación en gel de la invención	60 µg /ml	28,2 ± 0,29
Clotrimazol en crema	96 µg /ml	0
	192 µg /ml	0
	480 µg /ml	0
	960 µg /ml	29,2 ± 0,53

Tabla 6. Sensibilidad de *C. albicans* frente a la formulación de AMB disuelta en DMSO, formulación en gel de la invención y clotrimazol en crema.

Con el fin de comprobar que la concentración de clotrimazol se corresponde con la teórica (1% p/p), se extrajo el clotrimazol a partir de la crema, usando DMSO, se impregnaron discos para ensayo y se comparó su actividad frente al disco patrón de clotrimazol Neo Sensitabs® el cual contiene 10 µg de clotrimazol. El diámetro de los halos observados fue el mismo en ambos casos. Adicionalmente, se prepararon diluciones con la formulación en gel de la invención a la misma concentración de 10 µg y se ensayaron conjuntamente con sus respectivos discos patrón de anfotericina B Neo Sensitabs®. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7. Es importante mencionar el hecho de que los halos de inhibición obtenidos con el clotrimazol, tanto en los discos impregnados con clotrimazol procedente de la formulación en crema



ES 2 387 440 A1

como en los discos patrón de clotrimazol Neo Sensitabs<sup>®</sup>, no son tan claramente definidos como los que se obtienen con la anfotericina B.

5

Halo de inhibición (mm)	
Anfotericina B en DMSO	26,9 ± 0,1
Formulación en gel de la invención	34,4 ± 0,1
Disco AMB Neo Sensitabs <sup>®</sup>	23,2 ± 0,4
Clotrimazol en crema	21,5 ± 0,5
Disco Clotrimazol Neo Sensitabs <sup>®</sup>	21,4 ± 0,5

10

Tabla 7. Sensibilidad comparativa de *C. albicans* frente a clotrimazol, tanto en la formulación en crema como en discos clotrimazol Neo Sensitabs<sup>®</sup>, y a anfotericina B, tanto la formulación en gel de la invención como AMB disuelta en DMSO. La concentración en todos los preparados y los discos Neo Sensitabs<sup>®</sup> fue de 10 µg de antifúngico por disco.

#### 15 Ejemplo 4. Actividad antileishmania, citotoxicidad y seguridad de uso

En primer lugar, se determinó la actividad antiparasitaria de la formulación en gel de la invención, gel de anfotericina B-γ-ciclodextrina en metilcelulosa (3% p/p), en distintas especies de *Leishmania*, y se comparó con la de una formulación que contenía únicamente el complejo anfotericina B-γ-ciclodextrina pero sin agente gelificante y con la de anfotericina B desoxicolato. Los promastigotes de distintas cepas fueron mantenidos mediante cultivos *in vitro* en 20 ml de medio de cultivo Schneider Drosophila (Sigma), en frascos de cultivo con tapas que permitían el intercambio aéreo (tissue Culture Flask 25 cm<sup>2</sup> SARTED). Los frascos se incubaron en posición horizontal en estufa de incubación a 26°C. Se hicieron pases periódicos cada 7 días y para su conservación se congelaron 1x10<sup>7</sup> promastigotes, en fase estacionaria, en 1,5 ml de Suero Bovino Fetal, mediante congelación gradual. Se dispusieron en placas de microtitulación (SARSTED) promastigotes en fase de crecimiento logarítmico de las distintas cepas a una concentración de 1,25x10<sup>6</sup> promastigotes/ml y en un volumen final de 200 µl. Para la determinación de la

ES 2 387 440 A1

susceptibilidad a anfotericina B se prepararon diluciones seriadas de las formulaciones de anfotericina B en medio de cultivo Schneider (5, 2,5, 0,625, 0,312, 0,156, 0,078, 0,039 y 0,019 µg/ml), que se añadieron por triplicado a las placas de microtitulación. Se incubaron a 26°C en contacto con las formulaciones y, tras 48 horas, se determinó el efecto de la anfotericina B sobre la actividad metabólica del parásito por adición de 20 µl de una solución de resazurina 2,5 mM (Sigma) en PBS, dejándose en incubación durante 3 h a 26°C. A continuación, se determinó la intensidad de fluorescencia en espectrofluorímetro con una longitud de onda de excitación de 535 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. Se determinó el porcentaje de parásitos viables y la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) por el método de regresión Probit utilizando el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) v. 15.0. La tabla 8 muestra los resultados obtenidos.

Especies	AMB desoxicolato	AMB-γ-CD sin agente gelificante	Formulación en gel de la invención
<i>L. infantum</i>	0,029	0,056	0,126
<i>L. amazonensis</i>	0,336	0,307	0,346
<i>L. guyanensis</i>	0,124	0,133	0,365
LC3 <sup>+</sup>	0,101	0,095	0,135
LD1 <sup>+</sup>	0,066	0,07	0,107
<i>L. braziliensis</i>	0,048	0,057	0,201

Tabla 8. Concentraciones inhibitorias medias (IC<sub>50</sub>) obtenidas (en µg/ml) con las distintas formulaciones en las diferentes especies de *Leishmania* estudiadas. Aislados obtenidos de lesiones cutáneas en enfermos de Bolivia.

Los resultados de la tabla 8 muestran cómo la formulación constituida únicamente por el complejo anfotericina B-γ-ciclodextrina sin agente gelificante tiene una actividad equiparable, en la mayoría de especies estudiadas, a la formulación de anfotericina B desoxicolato (análogo de Fungizona®), a excepción del caso de *L. infantum*. Sin embargo, cuando se utilizó la formulación en gel de la invención se produjo un descenso de eficacia que posiblemente esté relacionado con la velocidad de liberación del gel (el gel se libera más lentamente que la disolución).

b) En segundo lugar, se estudió la citotoxicidad en cultivos de macrófagos de la línea J774. Los macrófagos se cultivaron en medio RPMI 1640 (Sigma) y se utilizaron, en

ES 2 387 440 A1

fase de crecimiento logarítmico, en placas de microtitulación (SARSTED) a una concentración de  $2,5 \times 10^5$  células/ml y en un volumen final de 200  $\mu$ l. Se prepararon diluciones seriadas de las distintas formulaciones de anfotericina B (ver tabla 8) en medio de cultivo RPMI-1640 (5, 2,5, 0,625, 0,156, 0,078, 0,039 y 0,019  $\mu$ g/ml), que se añadieron por triplicado a las placas de microtitulación. Se dejaron en incubación a 37°C en contacto con las formulaciones y, después de 24 horas, se añadieron 20  $\mu$ l de una solución de resazurina 2,5 mM (Sigma) en PBS, dejándose en incubación 3 h a 26°C. A continuación se determinó la intensidad de fluorescencia en espectrofluorímetro con una longitud de onda de excitación de 535 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. Se determinó el porcentaje de macrófagos viables y la concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>) por el método de regresión Probit utilizando el paquete estadístico SPSS v. 15.0. La tabla 9 muestra los resultados de citotoxicidad obtenidos.

	AMB desoxicolato	AMB- $\gamma$ -CD sin agente gelificante	Formulación en gel de la invención
CC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	11,52	4,25	98,77

Tabla 9. Resultados de citotoxicidad (CC<sub>50</sub>) de las formulaciones estudiadas.

De los resultados de la tabla 9 se deduce que la formulación constituida únicamente por el complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina sin agente gelificante es más citotóxica que la anfotericina B desoxicolato, sin embargo, cuando la primera se formula de tal forma que se obtiene la formulación en gel de la invención disminuye la toxicidad de una forma exponencial.

Si definimos el margen de seguridad (MS) de uso de un fármaco como el cociente entre las concentraciones tóxicas y eficaces, en este caso concreto, el MS se calcularía como el cociente entre CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub>. Los resultados de márgenes de seguridad para las distintas formulaciones estudiadas en las distintas especies de *Leishmania* se recogen en la tabla 10.

Especies	AMB desoxicolato	AMB- $\gamma$ -CD sin agente gelificante	Formulación en gel de la invención
<i>L. infantum</i>	397	75,9	783
<i>L. amazonensis</i>	34,3	14,7	283
<i>L. guyanensis</i>	92,9	31,95	270,6
LC3*	114	44,7	731,6
LD1*	174,5	60,7	923,1

ES 2 387 440 A1

<i>L. braziliensis</i>	240	74,6	491,4
------------------------	-----	------	-------

Tabla 10. Márgenes de seguridad obtenidos como cociente entre  $CC_{50}$  e  $IC_{50}$ . Aislados procedentes de lesiones cutáneas en enfermos de Bolivia.

Teniendo en cuenta que la formulación en gel de la invención se compara con  
5 formulaciones de anfotericina cuya comercialización ha sido aprobada por las  
agencias reguladoras pertinentes (lo que indica, entre otras cosas, que dichas  
formulaciones presentan un perfil de seguridad suficiente para su comercialización),  
los resultados de la tabla 10 muestran claramente que el gel en estudio presenta unas  
características de seguridad no sólo muy adecuadas para su uso *in vivo* sino además  
10 bastante mejores que las que presentan las formulaciones actualmente en el mercado.  
Se concluye, por tanto, que la formulación en gel de la invención es sensiblemente  
más segura para su administración en seres humanos y animales en comparación con  
la formulación que actualmente se prescribe para su administración en seres humanos  
y con la formulación constituida únicamente por el complejo AMB- $\gamma$ -CD sin agente  
15 gelificante (tabla 9) al ser drásticamente menos tóxica que estas dos formulaciones.

#### 4.1. Actividad leishmanicida *in vivo* sobre el criceto dorado

Se establecieron dos grupos de 5 cricetos dorados, a los que se les administró en la  
20 almohadilla plantar de la pata posterior izquierda, a día 0 y por inyección subcutánea,  
 $1 \times 10^7$  promastigotes metacíclicos en 0,5ml de una solución de *L. amazonensis* en  
medio Schneider. En ningún caso se infectó la pata posterior derecha de los cricetos ni  
ninguna de las patas anteriores. En ningún caso se administró tratamiento en la pata  
posterior derecha de los cricetos ni en ninguna de las patas anteriores.

25 El día 37 *postinfección* (p.i.) se inició el tratamiento tópico con la formulación en  
pomada de la invención, mediante aplicación con espátula sobre la almohadilla plantar  
de la pata posterior izquierda e inmovilización durante 2 horas. Tras esta primera  
aplicación, se repitió el tratamiento cada 24 horas durante los 4 días siguientes  
30 completando un tratamiento de 5 días en total. Durante los días de tratamiento con la  
formulación en pomada de la invención, días 37 al 41, la pata que recibió el

ES 2 387 440 A1

tratamiento se mantuvo vendada y por ese motivo no se disponen datos durante ese intervalo de días.

El tamaño de la inflamación, característica de la infección por *L. amazonensis*, se determinó semanalmente por la medida del diámetro de las patas posteriores izquierdas infectadas y derechas no infectadas, con ayuda de un calibrador (Vernier Caliper), hasta la finalización del experimento en el día 58 p.i. (ver tabla 11).

GRUPO	CONTROL				FORMULACIÓN EN POMADA DE LA INVENCION			
	Pata izquierda infectada no tratada		Pata derecha ni infectada ni tratada		Pata izquierda infectada y tratada		Pata derecha ni infectada ni tratada	
	D (mm)	± DS	D (mm)	± DS	D (mm)	± DS	D (mm)	± DS
0	4,42	± 0,44	3,72	± 0,18	3,58	± 0,53	3,34	± 0,21
6	3,34	± 0,27	3,34	± 0,36	3,50	± 0,23	3,38	± 0,15
13	3,82	± 0,35	3,12	± 0,16	3,60	± 0,23	3,34	± 0,09
20	5,76	± 0,23	3,64	± 0,18	4,70	± 0,86	3,32	± 0,60
28	6,04	± 0,75	3,30	± 0,21	5,88	± 0,19	3,38	± 0,19
34	7,06	± 0,86	3,32	± 0,26	6,62	± 0,53	3,60	± 0,20
40	7,90	± 1,10	3,60	± 0,41	ND	ND	ND	ND
48	7,70	± 0,89	3,44	± 0,25	6,80	± 0,49	3,48	± 0,15
51	7,56	± 0,57	3,42	± 0,28	7,13	± 0,49	3,65	± 0,45
58	8,70	± 1,16	3,52	± 0,24	6,98	± 0,41	3,40	± 0,08

Tabla 11. Evolución de la inflamación en la almohadilla plantar de la pata posterior izquierda de criceto dorado por infección con *L. amazonensis* en relación a la pata posterior derecha, ni infectada ni tratada. Clave: D: diámetro, DS: desviación estándar, ND: No Determinado.

Los resultados recogidos en la Tabla 11 y en la Figura 5 muestran una clara tendencia hacia la reducción de la intensidad de la inflamación inducida por la infección después de la aplicación del tratamiento con la formulación en pomada de la invención durante 5 días (área recuadrada en figura 5), pasados los cuales y suspendido el tratamiento, el tamaño de la lesión tiende a estabilizarse.

ES 2 387 440 A1

**Ejemplo 5. Análisis de la estabilidad química de las formulaciones de la invención (gel y colirio) en comparación con Fungizona®**

Se empleó un método desarrollado para el análisis de anfotericina B en muestras biológicas (Espada R, Josa JM, Valdespina S, Dea MA, Ballesteros MP, Alunda JM and Torrado JJ. HPLC assay for determination of amphotericin B in biological samples. Biomedical Chromatography. 2008; 22 (4): 402-407), descartándose previamente cualquier posible interferencia por parte de los componentes de la formulación a través del análisis de los correspondientes placebos (formulaciones que contienen todos los excipientes pero sin anfotericina B). En la tabla 12 se muestran las buenas características de estabilidad de la formulación en gel de la invención. Dicha estabilidad se deduce de la escasa variación en el tiempo del valor de la concentración de anfotericina B. La formulación a evaluar (formulación en gel de la invención) se conservó a temperatura ambiente y protegida de la luz y, además de la determinación de la concentración de anfotericina B por cromatografía líquida, se midió el pH y se hizo un barrido en el espectrofotómetro para evaluar si mantenía el estado de agregación monomérico. En ninguno de los tres análisis se produjeron variaciones notables, es decir, no se apreciaron cambios significativos en la concentración de anfotericina, la formulación mantuvo su valor de pH entre 5,0 y 5,5 y no se observaron variaciones en el estado de agregación.

Concentración de anfotericina B (% p/p)	
Tiempo cero	100,0 % $\pm$ 0,007
Primer mes	101,2 % $\pm$ 0,003
Segundo mes	100,5 % $\pm$ 0,006
Tercer mes	99,1 % $\pm$ 0,005
Cuarto mes	99,8 % $\pm$ 0,008
Quinto mes	100,6 % $\pm$ 0,002
Sexto mes	99,1 % $\pm$ 0,013

Tabla 12. Concentración de anfotericina B en la formulación en gel de la invención determinada por cromatografía líquida.

ES 2 387 440 A1

Se estudió también la estabilidad química de la formulación menos viscosa (colirio) de la invención y se comparó con la formulación comercial convencional de la anfotericina B (anfotericina B desoxicolato, análogo de Fungizona®).

5

Se prepararon dos formulaciones, en forma de colirio, del complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina. En la primera de las formulaciones se utilizó una solución fisiológica de cloruro de sodio como solvente, con la finalidad de proporcionar a la preparación la isotonicidad adecuada. En esta formulación se evaluaron el pH, el tamaño de partícula, el contenido de anfotericina B, la configuración monomérica, la esterilidad y la sensibilidad utilizando *C. albicans* como microorganismo de referencia. Los resultados se presentan en la tabla 13. En ella pueden observarse las diferencias entre los valores obtenidos con la formulación conservada en refrigeración frente a la conservada a temperatura ambiente.

15

		0 días	1 día	2 días	3 días	7 días	15 días	30 días
pH	t. amb.	7,5	-	-	-	7,5	7,5	7,5
	t. refriger.		-	-	-	7,5	7,5	7,5
Tamaño de partícula (nm)	t. amb.	1,2	-	-	-	4,2	2,2	1,8
	t. refriger.		-	-	-	0,96	657,3	1964,7
Estado agregación	t. amb.	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero
	t. refriger.		Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero
Contenido de anfotericina B (% p/p)	t. amb.	100,0	100,5	99,0	101,0	99,7	99,0	100,0
	t. refriger.		102,2	101,0	102,2	99,9	100,7	100,5
Sensibilidad de <i>C. albicans</i> (mm)	t. amb.	28,6	-	-	-	-	-	28,3
	t. refriger.		-	-	-	-	-	28,4
Esterilidad	t. amb.	Estéril	-	-	-	-	-	Estéril
	t. refriger.		-	-	-	-	-	Estéril

Tabla 13. Resultados obtenidos con la formulación en colirio de la invención con solución salina durante los 30 días evaluados con muestras a temperatura ambiente y en refrigeración.

20

ES 2 387 440 A1

La segunda formulación de colirio se preparó utilizando una solución de glucosa al 5% p/v como solvente. Los ensayos realizados fueron los mismos que los que se llevaron a cabo sobre la primera formulación. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 14. En ella pueden observarse las diferencias entre los valores obtenidos con la formulación conservada en refrigeración frente a la conservada a temperatura ambiente.

		0 días	1 día	2 días	3 días	7 días	15 días	30 días
pH	t. amb.	7,7	-	-	-	7,6	7,6	7,6
	t. refrig.		-	-	-	7,6	7,6	7,6
Tamaño de partícula (nm)	t. amb.	1,0	-	-	-	0,6	50,7	372,7
	t. refrig.		-	-	-	0,9	48,7	1102,0
Estado agregación	t. amb.	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero
	t. refrig.		Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero
Contenido de anfotericina B (% p/p)	t. amb.	100,0	98,1	97,0	98,6	97,9	95,4	87,9
	t. refrig.		99,0	100,1	100,7	101,3	100,4	98,7
Sensibilidad de <i>C. albicans</i> (mm)	t. amb.	29,5	-	-	-	-	-	29,1
	t. refrig.		-	-	-	-	-	29,1
Esterilidad	t. amb.	Estéril	-	-	-	-	-	Estéril
	t. refrig.		-	-	-	-	-	Estéril

Tabla 14. Resultados obtenidos con la formulación en colirio de la invención con solución glucosa al 5% p/v durante los 30 días evaluados con muestras a temperatura ambiente y en refrigeración.

De la comparación de resultados de las tablas 13 y 14 podemos deducir que el medio en el que se disperse la anfotericina B (suero salino o glucosado) tiene un efecto crítico en la estabilidad química, siendo ésta mayor en medio salino. Por otra parte, por los datos de tamaño de partícula se observa que en ambos medios existe una tendencia a la formación de agregados y/o precipitados.

Se preparó también una formulación de anfotericina B desoxicolato en forma de colirio, a fin de hacer el estudio comparativo respecto a las dos formulaciones



ES 2 387 440 A1

anteriores. A pesar de obtener mejores resultados de estabilidad química con la formulación de anfotericina B disuelta en suero salino, se optó por la dilución de anfotericina B en suero glucosado para evitar la formación de precipitados (Martindale, Guía completa de consulta farmacoterapéutica, SC. Sweetman (director).

- 5 Pharma Editores S.L. 2003). Los ensayos realizados fueron los mismos que se llevaron a cabo sobre las dos formulaciones anteriores.

Para la formulación de anfotericina B desoxicolato en forma de colirio preparada en medio glucosado, se obtuvieron los resultados que se presentan en la tabla 15. Los datos de la tabla 15 muestran la inestabilidad de la formulación (en comparación con los datos de la tabla 14), evidenciada por el cambio en el pH, por la formación claramente visible de agregados que aumentaron notablemente el tamaño de partícula, y por el descenso en el porcentaje de anfotericina B.

15

		0 días	1 día	2 días	3 días	7 días	15 días	30 días
pH	t. amb.	7,4	-	-	-	6,3	5,4	5,2
	t. refrig.		-	-	-	7,3	5,0	4,3
Tamaño de partícula (nm)	t. amb.	1,6	-	-	-	0,9	3010	6200
	t. refrig.		-	-	-	0,9	3890	5800
Estado agregación	t. amb.	Dímero	Dímero	Dímero	Dímero	Dímero	Dímero	Dímero
	t. refrig.		Dímero	Dímero	Dímero	Dímero	Dímero	Dímero
Contenido de anfotericina B (% p/p)	t. amb.	100,0	96,1	94,7	100,6	97,0	93,7	83,6
	t. refrig.		97,2	98,6	100,7	98,8	98,9	95,3
Sensibilidad de <i>C. albicans</i> (mm)	t. amb.	21,8	-	-	-	-	-	21,2
	t. refrig.		-	-	-	-	-	21,1
Esterilidad	t. amb.	Estéril	-	-	-	-	-	Estéril
	t. refrig.		-	-	-	-	-	Estéril

Tabla 15. Resultados obtenidos con la formulación en colirio de anfotericina B desoxicolato con solución glucosa al 5% p/v durante los 30 días evaluados con muestras a temperatura ambiente y en refrigeración.

20

ES 2 387 440 A1

Los resultados indican que la formulación en colirio de la invención que contiene al complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina reconstituido en suero glucosado, mantiene sus propiedades químicas (contenido en anfotericina B) de una forma significativamente mejor (t-Student,  $P < 0,01$ ) que la formulación en colirio de anfotericina B desoxicolato. Especialmente importante es la diferencia en tamaño de partícula entre las dos formulaciones anteriores, existiendo una mayor agregación en la formulación comercial. Este hecho se intensifica al almacenar el producto a menor temperatura (nevera). La mayor inestabilidad de la formulación comercial se refleja también a través de los cambios en pH. Se puede concluir que las nuevas formulaciones de anfotericina B reivindicadas en la presente invención presentan unas características de estabilidad química superiores a las de la formulación de anfotericina B comercial de referencia (anfotericina B desoxicolato, análogo de Fungizona®).

15

**DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Figura 1 muestra el diagrama de solubilidad de anfotericina B en presencia de  $\gamma$ -ciclodextrina a 25°C. (Nota: el peso molecular de la anfotericina B es 924,1 g/mol y el de la  $\gamma$ -ciclodextrina es 1297 g/mol). Dicho diagrama representa la concentración (mM) de anfotericina B frente a la concentración (mM) de  $\gamma$ -ciclodextrina en el límite de solubilidad de la anfotericina B a 25°C. Como se observa en la figura, la función solubilidad se puede ajustar a la ecuación de una recta de expresión:  $y = 0,0161x - 0,1876$ . La bondad del ajuste de una recta de regresión se mide con  $R^2$  y en este caso concreto  $R^2 = 0,9964$ .

La Figura 2 representa los espectros de absorción infrarroja (IR) de la molécula de anfotericina B, la molécula  $\gamma$ -ciclodextrina, la mezcla física anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina (AMB-GCD) y el liofilizado de una disolución de anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina en una relación molar 1:70 y sin filtrar. En dichos espectros de absorción infrarroja se representa el porcentaje de transmitancia (% T) frente a la longitud de onda a la cual se produce absorción en la región de IR ( $\text{cm}^{-1}$ ).

ES 2 387 440 A1

La Figura 3 muestra un diagrama de barras comparativo de la inhibición (representada mediante los diámetros (medidos en mm) de los halos de inhibición obtenidos) a la que da lugar la formulación en gel de la invención (10 µg de anfotericina B, barra izquierda) sobre distintas cepas de hongos (cepas mostradas en el eje X) en comparación con la inhibición producida por discos patrón de anfotericina B Neo-Sensitabs® en MHA (discos con 10 µg de anfotericina B, barra derecha). El fabricante de los discos patrón de anfotericina B Neo-Sensitabs® señala los siguientes parámetros para determinar la sensibilidad de un microorganismo frente a anfotericina B (AMB): Resistente (R), si el halo de inhibición es menor de 10 mm. Intermedio (I), si la medida está entre 10 y 14 mm y Sensible (S), si la medida es mayor o igual de 15 mm.

En la Figura 4 se representa el dispositivo que se usó para realizar el ensayo de penetración de anfotericina B en biopelículas de hongos (ejemplo 3.4). La capa A corresponde a una placa con agar YNB-Galactosa a la que se adicionó anfotericina B en las dos formas (anfotericina B disuelta en DMSO y la formulación en gel de la invención). La capa B representa una membrana de 0,22 µm de diámetro de poro y 47 mm de diámetro con o sin biopelícula de *Candida albicans*. La capa C simboliza una membrana de 0,22 µm de diámetro de poro y 25 mm de diámetro que sirve de separación por contacto directo. La capa D se refiere a discos para ensayo de 6 mm de diámetro impregnados con 20 µl de PBS.

En la Figura 5 se observa la evolución en el tiempo (medido en días) del diámetro (mm) de la almohadilla plantar de las patas posteriores derecha e izquierda de los cricetos infectados, antes y después del tratamiento con la formulación en pomada de la invención. La serie representada mediante una doble línea fina continua corresponde a la evolución de la pata posterior izquierda (infectada pero sin tratamiento) de los cricetos que no recibieron tratamiento. La serie representada mediante una línea gruesa continua corresponde a la evolución de la pata posterior izquierda (infectada y con tratamiento) de los cricetos que recibieron tratamiento. La serie representada mediante una línea discontinua de rayas corresponde a la evolución de la pata posterior derecha (no infectada y sin tratamiento) de los cricetos que no recibieron tratamiento en su pata posterior izquierda. La serie representada mediante

ES 2 387 440 A1

una línea discontinua de puntos corresponde a la evolución de la pata posterior derecha (no infectada y sin tratamiento) de los cricetos que recibieron tratamiento en su pata posterior izquierda con la formulación en pomada de la invención.

- 5 Las fotografías de la Figura 6 muestran el detalle de la almohadilla plantar de la pata posterior izquierda de un animal testigo sin tratar (a) y de un animal después del tratamiento (b). El tratamiento se hizo desde el día 37 al 41.

ES 2 387 440 A1

## REIVINDICACIONES

- 1.- Formulación farmacéutica tópica que comprende un complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina y un excipiente tópico farmacéuticamente aceptable en la que la relación molar anfotericina B: $\gamma$ -ciclodextrina en dicha formulación está dentro del intervalo entre 1:50 y 1:200 y presentando la anfotericina B un estado de agregación monomérico en dicha formulación.
- 2.- Formulación farmacéutica según la reivindicación 1 en la que la relación molar entre la anfotericina B y la  $\gamma$ -ciclodextrina en dicha formulación es de 1:100.
- 3.- Formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que dicha formulación tiene forma de gel y comprende como excipiente tópico un excipiente adecuado para la preparación de geles.
- 4.- Formulación farmacéutica según la reivindicación 3 en la que el excipiente adecuado para la preparación de geles se selecciona entre derivados de celulosa, derivados de guar, polímeros vinílicos, polímeros carboxivinílicos, polímeros acrílicos, polímeros naturales, y/o combinaciones de los mismos.
- 5.- Formulación farmacéutica según la reivindicación 4 en la que el excipiente adecuado para la preparación de geles se selecciona entre metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y copolímeros reticulados de acrilato de alquilo C<sub>10-30</sub>.
- 6.- Formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en la que dicha formulación tiene forma de crema y comprende como excipiente tópico un excipiente adecuado para la preparación de cremas.
- 7.- Formulación farmacéutica según la reivindicación 6 en la que el excipiente adecuado para la preparación de cremas se selecciona entre siliconas, derivados de siliconas, bases emulgentes aceite/agua (O/A) de tipo no iónico, y/o combinaciones de los mismos.
- 8.- Formulación farmacéutica según la reivindicación 7 en la que el excipiente adecuado para la preparación de cremas se selecciona entre ciclometicona y dimeticona.
- 9.- Formulación farmacéutica según las reivindicaciones 1-2 en la que dicha formulación tiene forma de pomada y comprende como excipiente tópico un excipiente adecuado para la preparación de pomadas.
- 10.- Formulación farmacéutica según la reivindicación 9 en la que el excipiente adecuado para la preparación de pomadas se selecciona entre un excipiente adhesivo oral, parafina, derivados de parafina, bases agua/aceite (A/O), cremas agua/aceite (A/O), y/o combinaciones de los mismos.
- 11.- Formulación farmacéutica según la reivindicación 10 en la que el excipiente adecuado para la preparación de pomadas es una mezcla comprendida por

ES 2 387 440 A1

carboximetilcelulosa sódica, pectina y gelatina, en una base de polietileno y aceite mineral.

- 12.- Formulaci3n farmac3utica seg3n las reivindicaciones 1-2 en la que dicha formulaci3n tiene forma de colirio y comprende el complejo de anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina disuelto en suero salino o glucosado.
- 13.- Formulaci3n farmac3utica seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento de infecciones f3ngicas y/o parasitarias en seres humanos y/o animales.
- 14.- Formulaci3n farmac3utica seg3n la reivindicaci3n 13 en la que las infecciones f3ngicas comprenden micosis superficiales, cut3neas y mucocut3neas.
- 15.- Formulaci3n farmac3utica seg3n la reivindicaci3n 13 en la que las infecciones parasitarias comprenden leishmaniosis cut3nea.
- 16.- M3todo para preparar la formulaci3n farmac3utica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende:  
Etapa (a): preparar una disoluci3n en medio acuoso de  $\gamma$ -ciclodextrina y ajustar el pH a un valor entre 11,5 y 14,  
Etapa (b): a3adir anfotericina B a la disoluci3n de la etapa (a) en una relaci3n molar anfotericina B: $\gamma$ -ciclodextrina entre 1:50 y 1:200 y agitar constantemente hasta su completa disoluci3n,  
Etapa (c): ajustar el pH de la mezcla de la etapa (b) a un valor entre 4 y 8,  
Etapa (d): a3adir un excipiente t3pico farmac3uticamente aceptable a la soluci3n del complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina de la etapa (c).
- 17.- M3todo seg3n la reivindicaci3n 16 en el que en la etapa (a) el pH de la disoluci3n en medio acuoso de  $\gamma$ -ciclodextrina se ajusta a un valor de 12.
- 18.- M3todo seg3n las reivindicaciones 16-17 en el que en la etapa (b) la relaci3n molar anfotericina B: $\gamma$ -ciclodextrina es de 1:100.
- 19.- M3todo seg3n las reivindicaciones 16-18 en el que en la etapa (c) el pH de la mezcla anfotericina B: $\gamma$ -ciclodextrina se ajusta a un valor de 5,5.
- 20.- M3todo seg3n las reivindicaciones 16-19 en el que el excipiente t3pico de la etapa (d) es un excipiente adecuado para la preparaci3n de geles, y en el que se a3aden las siguientes etapas a continuaci3n de la etapa (d):  
Etapa (e): agitar suavemente,  
Etapa (f): dejar en reposo durante un tiempo comprendido entre un minuto y tres d3as; donde la formulaci3n farmac3utica que se prepara est3 en forma de gel.
- 21.- M3todo seg3n la reivindicaci3n 20 en el que el tiempo que hay que dejar en reposo la mezcla en la etapa (f) es de 24 horas.

ES 2 387 440 A1

- 22.- Método según las reivindicaciones 20-21 en el que el excipiente adecuado para la preparación de geles se selecciona entre derivados de celulosa, derivados de guar, polímeros vinílicos, polímeros carboxivinílicos, polímeros acrílicos, polímeros naturales, y/o combinaciones de los mismos.
- 23.- Método según la reivindicación 22 en el que el excipiente adecuado para la preparación de geles se selecciona entre metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y copolímeros reticulados de acrilato de alquilo C<sub>10-30</sub>.
- 24.- Método según las reivindicaciones 16-19 en el que el excipiente tópico de la etapa (d) es un excipiente adecuado para la preparación de cremas, y en el que se añade la siguiente etapa a continuación de la etapa (d):  
Etapa (e): agitar durante un tiempo comprendido entre un minuto y una hora; donde la formulación farmacéutica que se prepara está en forma de crema.
- 25.- Método según la reivindicación 24 en el que el excipiente adecuado para la preparación de cremas se selecciona entre siliconas, derivados de siliconas, bases emulgentes O/A de tipo no iónico, y/o combinaciones de los mismos.
- 26.- Método según la reivindicación 25 en el que el excipiente adecuado para la preparación de cremas se selecciona entre ciclometicona y dimeticona.
- 27.- Método según las reivindicaciones 16-19 en el que el excipiente tópico de la etapa (d) es un excipiente adecuado para la preparación de pomadas, y en el que se añaden las siguientes etapas a continuación de la etapa (c) y antes de la etapa (d):  
Etapa (c1): liofilizar el complejo anfotericina B- $\gamma$ -ciclodextrina de la etapa (c),  
Etapa (c2): pulverizar el liofilizado de la etapa (c1);  
donde la formulación farmacéutica que se prepara está en forma de pomada.
- 28.- Método según la reivindicación 27 en el que el excipiente adecuado para la preparación de pomadas se selecciona entre un excipiente adhesivo oral, parafina, derivados de parafina, bases A/O, cremas A/O, y/o combinaciones de los mismos.
- 29.- Método según la reivindicación 28 en el que el excipiente adecuado para la preparación de pomadas es una mezcla comprendida por carboximetilcelulosa sódica, pectina y gelatina, en una base de polietileno y aceite mineral.
- 30.- Método según las reivindicaciones 16-19 en el que se reemplazan las anteriores etapas (a) y (c) por las siguientes nuevas etapas (a') y (c'), respectivamente, añadiéndose además una nueva etapa (c'1) a continuación de la nueva etapa (c'), y omitiéndose adicionalmente la etapa (d):  
Etapa (a'): preparar una disolución de  $\gamma$ -ciclodextrina en suero salino o en suero glucosado y ajustar el pH de dicha disolución hasta un valor entre 11,5 y 14,0,  
Etapa (c'): ajustar el pH de la mezcla de la etapa (b) a un valor entre 7,2 y 7,6,  
Etapa (c'1): llevar a cabo una filtración esterilizante;  
donde la formulación farmacéutica que se prepara está en forma de colirio.

ES 2 387 440 A1

31.- Método según la reivindicación 30 en el que en la etapa (c') el pH de la mezcla preparada en la etapa (b) se ajusta a un valor de 7,4.



ES 2 387 440 A1

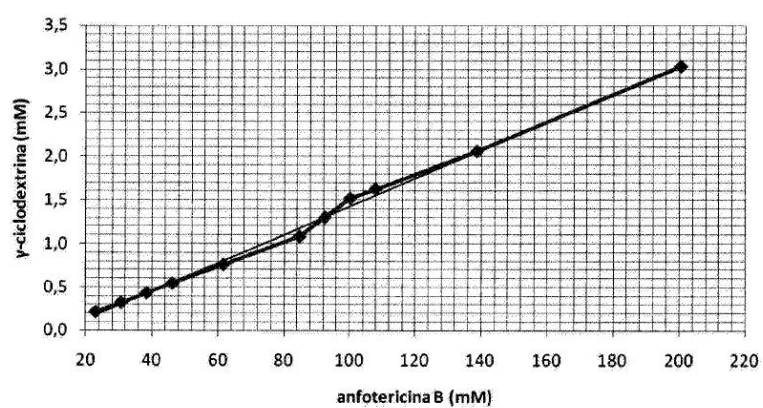


Figura 1

ES 2 387 440 A1

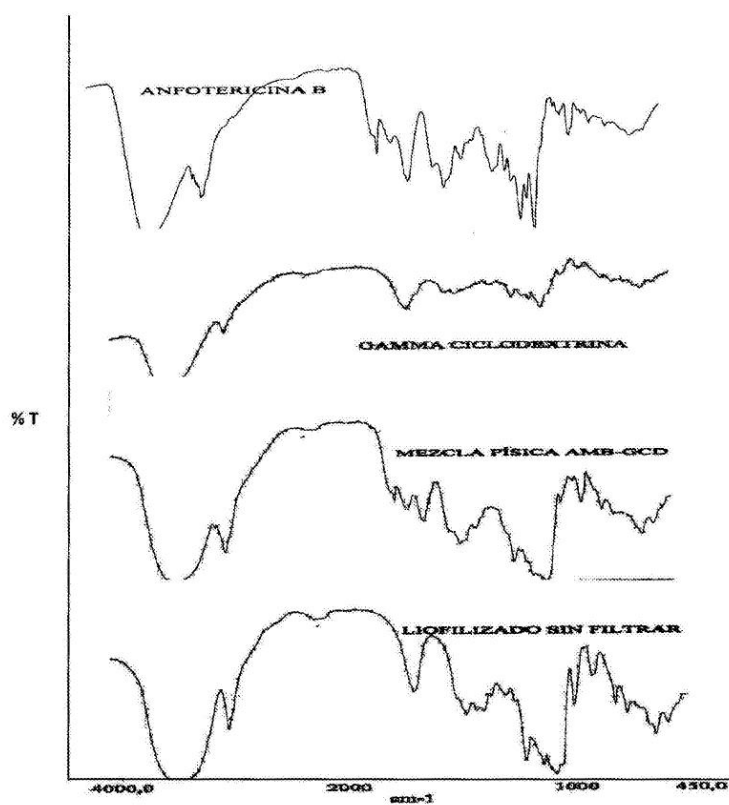


Figura 2

ES 2 387 440 A1

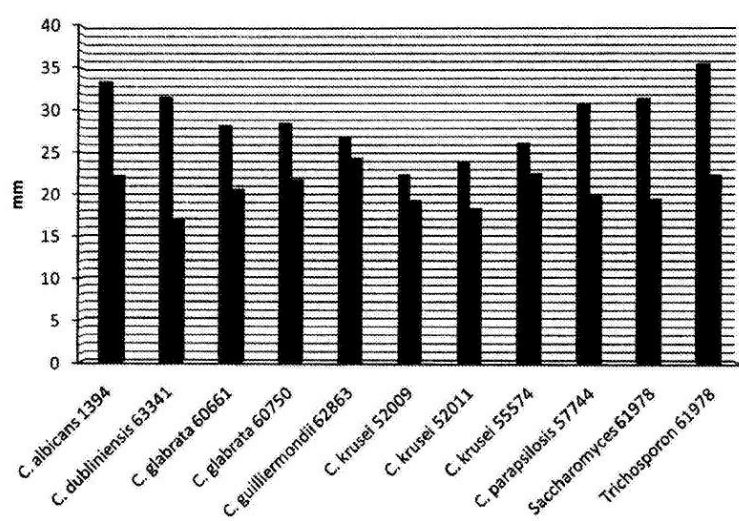


Figura 3

ES 2 387 440 A1

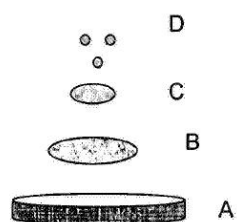


Figura 4

ES 2 387 440 A1

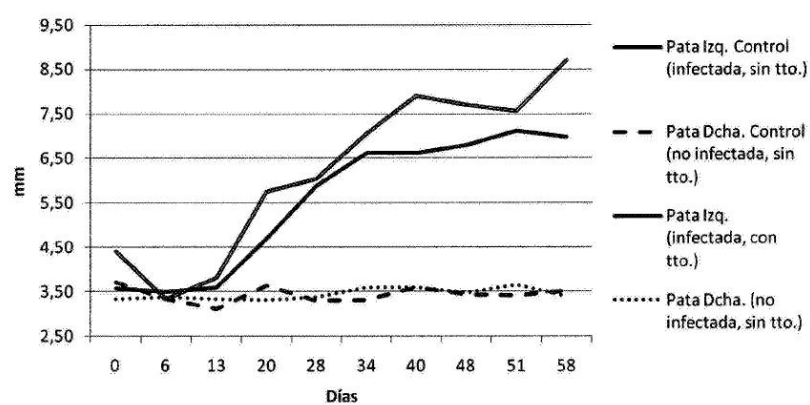


Figura 5

ES 2 387 440 A1

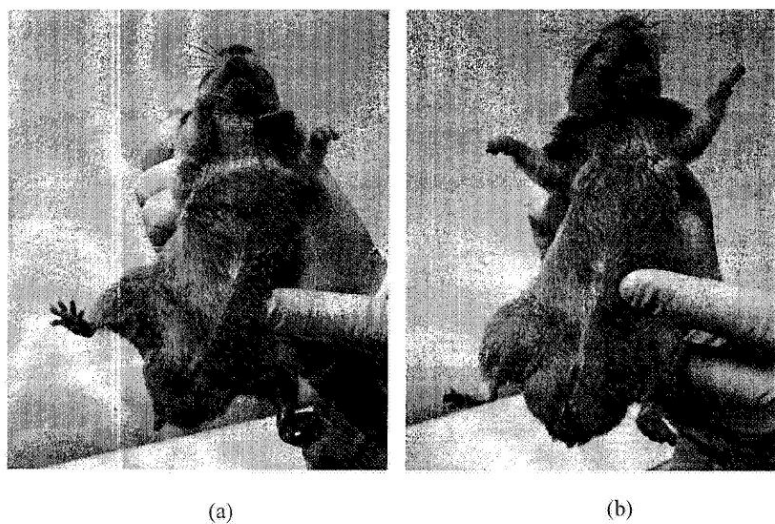


Figura 6



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201001230

22 Fecha de presentación de la solicitud: 27.09.2010

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

5 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 4883785 A (CHOW ET AL.) 28.11.1989, columna 2, líneas 8-37; columna 3, líneas 22-46; ejemplos.	1-31
A	KIM, YE-TAE et al.; A thermosensitive vaginal gel formulation with HPyCD for the pH-dependent release and solubilization of amphotericin B; European Journal of Pharmaceutical Sciences 41 (2010) 399-406; disponible online 21.07.2010.	1-31
A	KAJTÁR, M. et al; Aggregation of amphotericin B in the presence of $\gamma$ -cyclodextrin; Biopolymers, volumen 28, número 9, páginas 1585-1596 (1989); ISSN 0006-3525.	1-31
A	WO 9927940 A1 (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM) 10.06.1999, página 2, línea 27 – página 3, línea 30.	1-31
<p>Categoría de los documentos citados</p> <p>X: de particular relevancia</p> <p>Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría</p> <p>A: refleja el estado de la técnica</p> <p>O: referido a divulgación no escrita</p> <p>P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud</p> <p>E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud</p>		
<p>El presente informe ha sido realizado</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones</p> <p><input type="checkbox"/> para las reivindicaciones nº:</p>		
Fecha de realización del informe 06.09.2012	Examinador N. Vera Gutierrez	Página 1/4

INFORME DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

Nº de solicitud: 201001230

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K31/7048** (2006.01)

**A61K47/48** (2006.01)

**A61K47/40** (2006.01)

**A61K9/06** (2006.01)

**A61K9/08** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, REGISTRY, CAS, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL



OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 201001230

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.09.2012

**Declaración**

**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 3-12, 19-31

**SI**

Reivindicaciones 1, 2, 13-18

**NO**

**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones

**SI**

Reivindicaciones 1-31

**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

## OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 201001230

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 4883785 A (CHOW et al.)	28.11.1989
D02	KIM, YE-TAE et al.; European Journal of Pharmaceutical Sciences 41 (2010) 399-406; disponible online 21.07.2010.	21.07.2010

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La invención se refiere a una formulación farmacéutica tópica que comprende un complejo anfotericina B - gamma-ciclodextrina y un excipiente tópico aceptable, en la que la relación molar anfotericina B : gamma-ciclodextrina está dentro del intervalo entre 1:50 y 1:200 y presentando la anfotericina B un estado de agregación monomérico.

El documento D01 divulga un complejo de anfotericina B y gamma-ciclodextrina en el que la relación molar anfotericina B : gamma-ciclodextrina está entre 1:20 y 1:100, preferentemente entre 1:30 y 1:100 y más preferentemente, entre 1:40 y 1:100 (columna 2, líneas 8-37). Se consigue así mejorar la estabilidad y la solubilidad de la anfotericina B. En los ejemplos se describe la preparación de distintos complejos a partir de una disolución acuosa de gamma-ciclodextrina cuyo pH se ajusta a 12,6 y a 11,5 (ejemplos 1, 3 y ejemplos 2, 4, respectivamente). Se añade a continuación anfotericina B y se ajusta el pH a un valor alrededor de 7,5 - 8. La relación molar anfotericina B : gamma-ciclodextrina es 1:2 (ejemplos 1, 3) y 1:50 (ejemplos 2, 4). En la columna 3, líneas 22-46 se indica que los complejos obtenidos pueden presentarse en formulaciones líquidas, sólidas, semisólidas ..., siendo estas últimas efectivas en infecciones tópicas.

Por ello, se considera que las reivindicaciones 1, 2, 13-18 de la solicitud no son nuevas (Artículo 6.1 L.P.).

Respecto a las reivindicaciones 3-12, 19-31 relativas a la presentación de la formulación en forma de gel, crema, pomada y colirio y a sus métodos de preparación y excipientes empleados en cada caso, se considera que no poseen actividad inventiva dado que se trata de las formas farmacéuticas habituales destinadas a la administración tópica de sustancias activas y cuya preparación forma parte de la práctica galénica habitual que un experto en la materia aplicaría sin necesidad de un esfuerzo inventivo. De igual manera, no es posible reconocer actividad inventiva al empleo de los excipientes mencionados, en ausencia de una ventaja técnica asociada a esa selección, dado que se trata de excipientes habituales en el estado de la técnica para la obtención de este tipo de formulaciones tópicas. Por ejemplo, en el documento D02 se describe una formulación en forma de gel de aplicación vaginal que contiene un complejo de anfotericina B e hidroxipropil-gamma-ciclodextrina. En los apartados 2.3 y 2.5 se prepara la formulación en gel del complejo obtenido a partir de una solución de hidroxipropil-gamma-ciclodextrina (150 mg; 0,1 mmol) cuyo pH se ajusta a 11,5, a la cual se añade anfotericina B (2mg; 0,002 mmol), ajustando el pH a aproximadamente 7.

Por tanto, se considera que la invención tal como se define en las reivindicaciones 3-12, 19-31 de la solicitud, no implica actividad inventiva (Artículo 8.1 L.P.).

